



# Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires : Cas des hémocytes de bivalves atteints de neoplasie disséminée

Fabienne Le Grand

## ► To cite this version:

Fabienne Le Grand. Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires : Cas des hémocytes de bivalves atteints de neoplasie disséminée. Chimie analytique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2010. Français. NNT : . tel-00684750

**HAL Id: tel-00684750**

**<https://theses.hal.science/tel-00684750>**

Submitted on 3 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Sciences de la Matière ; Spécialité : Chimie Analytique*

**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Fabienne Le Grand**

Préparée à l'UFR Sciences et Techniques  
de Brest

Etude des relations entre  
compositions  
membranaires lipidiques et  
fonctions cellulaires:  
Cas des hémocytes de  
bivalves atteints de  
néoplasie disséminée

**Thèse soutenue le 14 mai 2010**

devant le jury composé de :

**Réjean TREMBLAY**

Professeur, ISMER, Rimouski / *Rapporteur*

**Gilles BARNATHAN**

Professeur, EA 2160, Nantes / *Rapporteur*

**Michel AUFFRET**

Professeur, UMR-CNRS 6539, Plouzané / *Examineur*

**Xavier de MONTAUDOUIN**

Maître de conférences, UMR-CNRS 5805, Arcachon / *Examineur*

**Yanic MARTY** / *Directeur de thèse*

Ingénieur de recherche, UMR-CNRS 6521, Brest / *Examineur*

**Edouard KRAFFE**

Maître de conférences, UMR-CNRS 6521, Brest / *Examineur*

**Philippe SOUDANT**

Chargé de recherche, UMR-CNRS 6539, Plouzané / *Membre invité*



## REMERCIEMENTS

*Je remercie la Région Bretagne de m'avoir soutenue par le financement d'une bourse de thèse.*

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Yanic Marty. Tu as su m'initier, moi, biologiste de formation, à la chimie analytique. Tu m'as transmis petit à petit tes connaissances, ton expérience, ton savoir-faire et, plus encore, ta passion pour la recherche et pour les lipides marins. Tu m'as appris la précision et la minutie. Ta présence quotidienne à mes côtés m'a été très importante et très enrichissante, tant au niveau scientifique, que technique et qu'humain. Merci Yanic !*

*Je remercie également mes deux co-directeurs, Edouard Kraffe et Philippe Soudant. Doudou, tu as vraiment été plus qu'un encadrant. Tu as su être là à chaque fois que j'en avais besoin. Tu as su me booster, me motiver, me remonter le moral et me parler franchement lorsque cela était nécessaire. A toutes ces qualités humaines s'ajoutent ton esprit d'initiative, ta volonté d'aller toujours de l'avant ainsi que ton immense curiosité scientifique. Travailler avec toi, c'est élargir ses idées!*

*Philippe, ou le cerveau sur pattes. Je resterai impressionnée par ta capacité et ta rapidité de réflexion. Mais également par le nombre de corrections, de recorections et de « oh, ben non en fait au début c'était mieux ! »... Tu m'as été d'une aide immense pour l'organisation des idées, pour décider de la marche à suivre, pour rédiger, mais aussi pour toute la partie fonctionnelle. Je sais maintenant utiliser un cytomètre (et quelles que soient les conditions !).*

*Ce fut plus qu'un plaisir de partager ces années avec vous trois. En espérant que cela puisse de nouveau être le cas !*

*Je remercie également l'équipe du LEMAR. Tout d'abord Nelly Le Goac (oups ! Le Goïc). Tu as toujours été présente pour m'aider, m'initier, me conseiller. Merci également à Christophe Lambert, Marcel Koken, Hansy Haberkorn, Ludovic Donaghy, Hélène Hégaret, Agnès Travers, Caroline Fabieux, et tous les autres pour les manips, les discussions, les idées, .... Grâce à vous, venir à l'IVEM était toujours un moment de plaisir enrichissant !*

*Je remercie également l'équipe de la Station Marine d'Arcachon, pour m'avoir accueillie et aidée lors mes nombreux séjours. Merci à Xavier de Montaudouin, pour m'avoir permis d'étudier la néoplasie disséminée. Je remercie également Ika Paul-Pont, pour son aide et nos encouragements mutuels à propos de « l'état d'avancement » de nos thèses ! Enfin, un grand merci à tous les autres collègues arcachonnais, notamment Patrice Gonzalez, Alexia Legay, Florence Jude et Nathalie Raymond, pour leur aide lors des sessions de pêche et de prélèvement d'hémolymphe.*

*Cette thèse a également été réalisée en collaboration avec des équipes étrangères. Je remercie Antonio Villalba pour m'avoir permis de venir à deux reprises dans son laboratoire, le CIMA de Villagarcia de Arousa (Espagne). J'ai également pu me rendre au Canada grâce à une bourse du Réseau Aquacole du Québec. Je remercie vivement Réjean Tremblay, membre de mon comité de thèse, qui m'a accueilli à l'ISMER de Rimouski (Québec). Je remercie également Ahmed Siah qui m'a reçue au laboratoire de pathologie et de microbiologie, à Charlottetown (île du Prince Édouard) ainsi que Julie Pariseau, qui m'a hébergée et qui m'a aidée pour les expériences réalisées lors de ce séjour.*

*Lors de cette thèse, j'ai pu encadrer deux stagiaires, Laure et Marion. Je les remercie vivement pour tout le travail qu'elles ont réalisé. Deux drôles d'énergumènes sont également passés par le labo : Malwenn et Nicolas. Ils ont mis l'ambiance dans le lab ! Malwenn, ta joie de vivre et ton énergie étaient « un rayon de soleil » dans ma thèse !*

*Je remercie également tous mes amis de Concarn' (Nat, Jé, Sophie, Lo, Brenda, Ced, Mick, Ben, Yara, Juju, Arnaud (merci pour l'hébergement à Saint-Nazaire en fin de thèse !), Kev, Yo, Clôclo, Marie, Soazic et tous les autres), toujours fidèles au poste après tant d'années. C'est vrai qu'on s'est un peu moins vus pendant la thèse (tiens, bizarre...), mais merci de m'avoir attendue !*

*Un immense merci à mes parents, Henri et Marie-France. Ils ont été présents du début à la fin. Ils m'ont toujours aidée, encouragée, soutenue. Merci également à mon frère Damien, toujours OK pour donner un coup de main.*

*Enfin, mention spéciale à celui qui a partagé ma vie de thésarde, Yann. Tu m'as soutenue, coachée, changé les idées, fait rire, déstressée, fait garder les pieds sur terre... et bien plus encore ! MERCI!!!*







# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>1</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>15</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>23</b>
<b>1 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES BIVALVES.....</b>	<b>23</b>
1.1 HÉMOCYTES.....	23
1.2 TYPES D'HÉMOCYTES ET LEUR ORIGINE .....	24
1.3 FONCTIONS DES HÉMOCYTES .....	26
<b>2 LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE.....</b>	<b>31</b>
2.1 DÉFINITION.....	31
2.2 LES CELLULES NÉOPLASIQUES .....	32
2.3 PATHOLOGIE PROGRESSIVE ET INVASIVE .....	33
2.4 ÉTIOLOGIE DE LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE .....	33
2.5 ÉCOLOGIE DE LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE.....	34
2.6 NÉOPLASIE DISSÉMINÉE ET IMMUNITÉ.....	35
2.7 MÉTHODES DE DIAGNOSTIC : HISTOLOGIE VS. CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	36
2.8 CONTENU EN ADN DES CELLULES NÉOPLASIQUES .....	38
<b>3 LES LIPIDES.....</b>	<b>40</b>
3.1 DÉFINITION.....	40
3.2 LIPIDES MEMBRANAIRES VS. LIPIDES DE RÉSERVE .....	41
3.3 LIPIDES MEMBRANAIRES ET MEMBRANES CELLULAIRES.....	42
3.4 STRUCTURE DES LIPIDES MEMBRANAIRES .....	44
3.5 COMPOSITIONS LIPIDIQUES MEMBRANAIRES .....	50
3.6 BIOSYNTHÈSE DES LIPIDES MEMBRANAIRES .....	54

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>74</b>
<b>1 CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DE LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE CHEZ LA COQUE DU BASSIN D'ARCACHON..</b>	<b>76</b>
1.1 SITE D'ÉTUDE .....	76
1.2 SUIVI SAISONNIER ET ÉTUDE SURFACE-PROFONDEUR.....	77
1.3 PRÉLEVEMENT D'HÉMOLYPHE.....	78
1.4 HISTOLOGIE .....	80
1.5 ESTIMATION DU CONTENU EN ADN PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	85
<b>2 DIAGNOSTIC DE LA NEOPLASIE DISSÉMINÉE CHEZ LA MYE DE L'ÎLE DU PRINCE EDOUARD.....</b>	<b>94</b>
<b>3 ÉTUDE DES PARAMÈTRES FONCTIONNELS DES CELLULES IMMUNITAIRES DE BIVALVES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX</b>	<b>95</b>
3.1 COQUES.....	96
3.2 MYES .....	104
<b>4 ANALYSE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE DES HEMOCYTES .....</b>	<b>108</b>
4.1 PRÉLEVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS D'HÉMOLYPHE POUR L'EXTRACTION DES LIPIDES DES HÉMOCYTES .....	108
4.2 SÉPARATION LIPIDES NEUTRES / LIPIDES POLAIRES SUR MICROCOLONNE DE SILICE .....	113
4.3 SÉPARATION DES CLASSES DE LIPIDES POLAIRES PAR CLHP .....	114
4.4 ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS .....	116
4.5 SÉPARATION DES CLASSES DE LIPIDES NEUTRES PAR CCMHP.....	119
<b>5 ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>120</b>
<b>CHAPITRE 1 : COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE DES HÉMOCYTES.....</b>	<b>125</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>125</b>
<b>2 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DES MEMBRANES D'HÉMOCYTES CHEZ L'HUÎTRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS ET LA PALOURDE JAPONAISE RUDITAPES PHILIPPINARUM.....</b>	<b>127</b>
<b>3 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DES MEMBRANES D'HÉMOCYTES CHEZ DEUX POPULATIONS AFFECTÉES PAR LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE : LA COQUE CERASTODERMA EDULE ET LA MYE MYA ARENARIA .....</b>	<b>155</b>
3.1 RESULTS.....	156
3.2 DISCUSSION .....	166

<b>4 ACIDES GRAS « NON-METHYLENE-INTERRUPTED », 20:1N-11 ET PLASMALOGÈNES CHEZ LES QUATRE</b>	
<b>ESPÈCES DE BIVALVES ÉTUDIÉES.....</b>	<b>169</b>
4.1 NMI FA.....	169
4.2 NMI FA AND 20:1N-11.....	172
<b>5 CONCLUSION .....</b>	<b>173</b>
 <b><u>CHAPITRE 2 : NÉOPLASIE DISSÉMINÉE .....</u></b>	 <b><u>179</u></b>
 1 INTRODUCTION .....	 179
2 PRÉVALENCE, INTENSITÉ ET CARACTÉRISTIQUES DE L'ANEUPLOÏDIE DE LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE CHEZ	
LES COQUES ( <i>CERASTODERMA EDULE</i> ) DU BASSIN D'ARCACHON : VARIATION SAISONNIÈRE ET POSITION DANS LE	
SÉDIMENT	181
3 CARACTÉRISTIQUES DE LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE CHEZ LA MYE <i>MYA ARENARIA</i> DE L'ÎLE DU PRINCE	
EDOUARD (CANADA).....	191
3.1 RÉSULTATS .....	191
3.2 DISCUSSION .....	197
4 CONCLUSION.....	202
 <b><u>CHAPITRE 3 : NÉOPLASIE DISSÉMINÉE, COMPOSITIONS LIPIDIQUES ET FONCTIONS</u></b>	
<b><u>CELLULAIRES DES HÉMOCYTES .....</u></b>	<b><u>207</u></b>
 1 INTRODUCTION .....	 207
2 ALTERATIONS DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE ET DES PARAMÈTRES FONCTIONNELS DES	
CELLULES CIRCULANTES DE COQUES ( <i>CERASTODERMA EDULE</i> ) AFFECTÉES PAR LA NÉOPLASIE DISSÉMINÉE.....	209
3 EFFET DE LA NEOPLASIE DISSÉMINÉE SUR LES COMPOSITIONS LIPIDIQUES MEMBRANAIRES ET LES	
FONCTIONS CELLULAIRES DES HÉMOCYTES DE MYE ( <i>MYA ARENARIA</i> ).....	251
3.1 RÉSULTATS .....	252
3.2 DISCUSSION .....	266
4 CONCLUSION.....	271
 <b><u>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</u></b>	 <b><u>277</u></b>
 1 RAPPEL DE LA PROBLÉMATIQUE .....	 277
2 ORIGINALITÉ DE L'ÉTUDE RÉALISÉE .....	277

<b>3</b>	<b>PRINCIPALES DÉCOUVERTES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>279</b>
	<b><u>LISTE DES TABLES .....</u></b>	<b><u>285</u></b>
	<b><u>LISTE DES FIGURES .....</u></b>	<b><u>287</u></b>
	<b><u>BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>	<b><u>297</u></b>







## ABREVIATIONS

**AGMI:** acide gras monoinsaturé

**AGPI:** acide gras polyinsaturé

**AGS:** acide gras saturé

**CAEP:** céramide aminoéthylphosphonate

**CCCP:** carbonyl cyanide m-chlorophényl  
hydrazone

**CCMHP:** chromatographie sur couche  
mince haute performance

**CL:** cardiolipide

**CLHP:** chromatographie liquide haute  
performance

**CPG:** chromatographie en phase gazeuse

**ERO:** espèces réactives de l'oxygène

**FA:** fatty acid

**FSC:** forward scatter

**GPL:** glycérophospholipide

**HPLC:** high performance liquid  
chromatographie

**LysoPC:** lysoglycérophosphatidylcholine

**MEAG:** methyl-ester d'acide gras

**MUFA:** monounsaturated fatty acid

**NMI:** non-methylene-interrupted

**PC:** glycérophosphatidylcholine

**PE:** glycérophosphatidyléthanolamine

**Plsm:** plasmalogène

**PI:** glycérophosphatidylinositol

**PL:** phospholipide

**PS:** glycérophosphatidylsérine

**PUFA:** polyunsaturated fatty acid

**ROS:** reactive oxygen species

**SFA:** saturated fatty acid

**SSC:** side scatter

**THC:** total hemocyte count



# INTRODUCTION GÉNÉRALE



## INTRODUCTION GENERALE

La cellule, élément constitutif de tous les êtres vivants, de même que les différents organites intracellulaires qu'elle contient (noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique...) sont délimités par une membrane. Cette membrane est composée d'une bicouche de lipides, majoritairement des phospholipides, dans laquelle sont insérées des protéines qui interviennent dans la majorité des fonctions cellulaires. Ces phospholipides sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire et de queues apolaires, majoritairement des acides gras. Cet assemblage constitue la barrière indispensable au maintien des différences entre le contenu des cellules (ou celui des organites intracellulaires) et leur environnement. Les membranes jouent ainsi un rôle de filtre très sélectif qui contrôle l'entrée et la sortie de substances spécifiques. Ces membranes biologiques ont également un rôle critique dans la physiologie cellulaire, puisqu'elles sont le lieu d'organisation de nombreux systèmes fonctionnels importants (Fyfe et al., 2001), tels que la chaîne respiratoire, les systèmes de synthèse protéique ou les systèmes de détoxification. Comparativement aux protéines, les lipides n'étaient que très peu considérés comme ayant une influence sur ces fonctions membranaires et n'étaient généralement appréhendés que comme constituants de fond. Cependant, il devient désormais de plus en plus évident que, outre ses caractéristiques physiques, les caractéristiques biologiques d'une membrane sont influencées par la nature même des phospholipides qui la constituent. Ainsi, bien que ce domaine reste encore assez peu connu, un nombre croissant d'études démontre que la composition lipidique des membranes cellulaires peut avoir des rôles fonctionnels et modulateurs importants.

Ainsi, une première école de pensée a développé la « théorie du pacemaker », soutenue par Hulbert et Else (1999). Il s'agit en fait d'une version plus moderne de la théorie de la mosaïque fluide, émise par Singer and Nicolson (Singer and Nicolson, 1972), dans laquelle les protéines membranaires sont considérées comme des icebergs flottant dans une mer de lipides. La théorie du pacemaker se base sur plusieurs postulats allant de l'animal

entier jusqu'aux mécanismes membranaires. En résumé, cette théorie propose que la composition globale en acides gras des lipides membranaires soit régulée et soit un déterminant important du taux métabolique. Plus précisément, elle postule que des membranes composées de phospholipides riches en acides gras polyinsaturés n-3 entraînent une activité moléculaire importante des protéines membranaires associées.

Cependant, il existe aussi certaines fonctions cellulaires, dépendant pourtant des lipides, qui ne répondent pas à des variations de composition globale en acides gras des membranes cellulaires. Une seconde hypothèse, basée sur une relation entre le micro-environnement lipidique des protéines et leur activité a peu à peu été consolidée. Ainsi, quelques lipides membranaires spécifiques conféreraient un micro-environnement particulier aux régions hydrophobes des protéines membranaires, résultant en un fonctionnement optimal de la protéine. La spécificité de ces lipides membranaires résiderait non seulement dans leur composition en acides gras, mais aussi dans la nature de leur tête polaire (choline, sérine, éthanolamine, inositol...) et de la liaison entre cette tête polaire et les acides gras (liaison ester, éther ou vinyl-éther). Ainsi, par exemple, la présence du cardiolipide a été mise en évidence comme essentielle au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, et sa composition en acides gras a été montrée comme pouvant moduler l'activité de cette chaîne (Schlame et al., 2000). Plus récemment, la découverte de domaines particuliers de la membrane plasmique, connus sous le nom de « lipid rafts » a renforcé l'importance du micro-polymorphisme lipidique membranaire (Pike, 2003; Vigh et al., 2005).

Parmi les constituants lipidiques membranaires, un type particulier de phospholipides, les plasmalogènes (1-*O*-alk-1'-enyl-2-acylglycérophospholipides) a retenu l'attention de notre équipe. Les plasmalogènes représentent une sous-classe de phospholipides caractérisée par la présence d'une liaison vinyl-éther en position *sn*-1 à la place de la liaison ester qui existe dans la sous-classe de phospholipides la plus commune, les diacylglycérophospholipides. Il est maintenant bien établi que les invertébrés marins sont particulièrement riches en plasmalogènes (Joseph, 1982; Sargent, 1989). En effet, ils présentent généralement des teneurs en plasmalogènes plus élevées que celles retrouvées,

chez les mammifères, dans les organes les plus riches en plasmalogènes, tels le cerveau, (Schrakamp et al., 1991), les cellules immunitaires ou le cœur (Nagan and Zoeller, 2001). En général, chez les mammifères comme chez les bivalves marins, la majorité des plasmalogènes présentent une tête polaire de type éthanolamine, et dans une moindre mesure, une tête choline (Nagan and Zoeller, 2001). Une particularité intéressante des mollusques est qu'ils sont les seuls êtres vivants qui contiennent, en plus des formes éthanolamine et choline, des plasmalogènes de type sérine (Dembitsky and Vaskovsky, 1976; Dembitsky, 1979). Bien que certaines fonctions aient été associées aux plasmalogènes, le rôle de ces molécules reste largement incertain à ce jour que ce soit chez les mammifères ou chez les bivalves. Toutefois, au même titre que chez les mammifères, les teneurs en plasmalogènes des bivalves marins ont été montrées comme variant fortement en fonction de l'organe considéré laissant supposer des rôles fonctionnels importants (Kraffe et al., 2004; 2006).

Récemment, la composition en acides gras des plasmalogènes de forme éthanolamine, choline et sérine a été étudiée pour la première fois chez les mollusques bivalves (Kraffe et al., 2004). Une incorporation sélective d'acides gras polyinsaturés particuliers dans les plasmalogènes, tels les acides gras "non-methylene-interrupted" (NMI) et le 20:1n-11 a été mise en évidence. Plus particulièrement, la composition en acides gras des formes éthanolamine et sérine des plasmalogènes présentait une forte spécificité pour ces acides gras. Ces acides gras NMI sont les seuls acides gras polyinsaturés que les bivalves peuvent synthétiser *de novo* (Zhukova, 1986; 1991). Cette association spécifique des plasmalogènes avec ces acides gras synthétisés *de novo* démontre une régulation de l'incorporation de l'acide gras en position *sn*-2 de cette sous-classe de phospholipides. Un rôle biologique fonctionnel important de ces espèces moléculaires de lipides membranaires a alors été supposé (Kraffe et al., 2004).

La présente thèse vise à apporter des éléments pour une meilleure compréhension de la relation entre la structure lipidique des membranes cellulaires et leurs fonctions. Plus particulièrement, il s'agit d'aller plus loin dans l'étude du rôle des plasmalogènes et de leur association spécifique avec des acides gras biosynthétisés. Pour cela, il serait idéal de

pouvoir modifier la composition lipidique des membranes cellulaires, en plasmalogènes par exemple, et d'observer les conséquences de ce changement au niveau fonctionnel. Comme cela est difficilement réalisable directement, du moins à notre niveau, une stratégie différente a été imaginée. Il s'agissait de trouver un facteur abiotique (température, hypoxie,...) ou biotique (état reproductif, pathologie, ...) qui induirait des variations de la composition lipidique membranaire et/ou des fonctions cellulaires dans les cellules étudiées.

Le choix du modèle biologique étudié s'est porté sur les mollusques bivalves. En effet, comme énoncé précédemment, les bivalves présentent des particularités lipidiques intéressantes telles que de fortes teneurs en plasmalogènes, la présence de la forme plasmalogène sérine et une association spécifique de ces plasmalogènes avec certains acides gras spécifiques. Lors de cette thèse, contrairement à des études réalisées sur des individus entiers ou même à une échelle inférieure, sur des organes, un objectif était de descendre à l'échelle cellulaire.

Pour ce faire, ce sont des hémocytes de bivalves qui ont été étudiés. Les hémocytes, qui sont les seules cellules circulantes de l'hémolymphe des bivalves, sont des cellules multifonctionnelles, jouant notamment un rôle crucial dans la défense immunitaire des bivalves, par des mécanismes de phagocytose et de production d'espèces actives de l'oxygène, mais aussi dans la réparation tissulaire et coquillière, le transport et la digestion de nutriments, et dans l'excrétion et la résorption gonadique (Cheng, 1996; Chu, 2000; Donaghy et al., 2009). Ainsi, les hémocytes ont des fonctions cellulaires bien identifiées et spécifiques. De plus, des expériences de nutrition ont montré chez l'huître *C. gigas* et la palourde *R. philippinarum* que certaines de ces fonctions spécifiques pouvaient être modulées par la composition globale en acides gras de leurs membranes cellulaires (Delaporte et al., 2003; Delaporte et al., 2006; Delaporte et al., 2007), démontrant pour la première fois de possibles relations entre structures membranaires et fonctions hémocytaires chez les bivalves.

Enfin, le facteur qui a été choisi pour cette étude, et pouvant potentiellement induire des variations de la composition lipidique membranaire des hémocytes et de leurs fonctions, est une pathologie, la néoplasie disséminée. Il s'agit d'un cancer, comparable à une



leucémie, touchant spécifiquement les hémocytes de bivalves. Cette maladie progressive est caractérisée par la prolifération d'hémocytes anormaux (cellules néoplasiques) dans l'hémolymph puis dans les tissus des bivalves touchés par la maladie. Les cellules néoplasiques diffèrent des hémocytes par une taille supérieure, une morphologie moins complexe, un noyau plus grand, un ratio noyau/cytoplasme plus élevé et un contenu en ADN anormal.

Cette pathologie touchant les hémocytes, on pouvait donc espérer des modifications des fonctions immunitaires des hémocytes et de leur composition lipidique. De plus, chez les mammifères, des études avaient mis en évidence des modifications des teneurs en lipides contenant une liaison de type vinyl-éther dans des cellules cancéreuses (Snyder and Wood, 1968; 1969; Howard et al., 1972; Ruggieri et al., 1999; Fallani et al., 2006). Ainsi, la néoplasie disséminée serait susceptible d'induire à la fois des modifications des fonctions immunitaires des hémocytes ainsi que des compositions en plasmalogènes, permettant de mieux comprendre le rôle de cette sous-classes de phospholipides.

Ce travail de thèse s'articule autour de 3 grands thèmes :

1- La caractérisation fine de la composition lipidique membranaire des hémocytes, c'est-à-dire la détermination des proportions des différentes classes et sous-classes de phospholipides ainsi que de leur composition respective en acides gras, chez quatre espèces de bivalves : deux espèces considérées comme non affectées par la néoplasie disséminée ; la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*), et deux autres touchées par cette maladie ; la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria* (Elston et al., 1992; Barber, 2004).

2- L'étude détaillée des paramètres caractéristiques de la néoplasie disséminée chez la coque du bassin d'Arcachon (France) et la mye de l'île du Prince Edouard (Canada) afin de mieux comprendre les modifications potentiellement induites par cette pathologie au niveau cellulaire.

3- L'étude de l'effet de la néoplasie disséminée sur les compositions lipidiques membranaires et les fonctions cellulaires d'hémocytes de coque et de mye.



# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1 LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES

#### 1.1 HEMOCYTES

Chez les mollusques, le système de défense est assuré essentiellement par les cellules et les molécules véhiculées par l'hémolymphe (et les fluides extra-palléaux dans le cas des bivalves) (Allam and Paillard, 1998; Paillard et al., 2004). Ces fluides contiennent un seul type de cellules, les hémocytes, et une panoplie de facteurs humoraux (Roch, 1999; Chu, 2000; Bachère et al., 2004). Les hémocytes sont des cellules clés puisque ce sont des cellules actives du système immunitaire, qui jouent un rôle dans de multiples fonctions. Ces cellules circulantes peuvent s'infiltrer dans les tissus pour rejoindre les sites d'infections et assurer la défense immunitaire de l'individu, notamment par des mécanismes de phagocytose et de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Chez les mollusques bivalves, les hémocytes peuvent également intervenir dans la réparation tissulaire et coquillière, le transport et la digestion de nutriments, l'excrétion et la résorption gonadique (Sparks and Morado, 1988; Cheng, 1996; Donaghy et al., 2009).

## 1.2 TYPES D'HEMOCYTES ET LEUR ORIGINE

De nombreuses publications traitent de la classification des hémocytes, chez les bivalves (Cheng, 1981; Hine, 1999), mais des controverses subsistent. En effet, selon le mode de classification (morphologique, cytologique ou enzymatique), la classification diffère. Cependant, bien qu'il existe également des blastes, ou cellules souches, on considère généralement deux grands types cellulaires : les granulocytes et les hyalinocytes (Cheng, 1996) (Figure 1). Les granulocytes sont caractérisés par la présence de granules intracytoplasmiques, alors que les hyalinocytes, au cytoplasme transparent, n'en présentent pas ou peu (Cheng, 1981). Leur proportion et leur taille varient fortement selon les espèces.

Au sein de ces deux grands types d'hémocytes, plusieurs sous-groupes peuvent être distingués chez certaines espèces de bivalves en fonction de leur taille ou de leur affinité pour certains colorants. Chez la coque *Cerastoderma edule*, étudiée au cours de la présente thèse, un seul type de granulocytes, mais deux types de hyalinocytes, les acidophiles et les basophiles, pouvaient être distingués (Figure 2).

L'origine de ces cellules reste floue. Certains auteurs suggèrent que les hémocytes proviendraient de la différenciation de cellules du tissu conjonctif (Auffret, 1988; Cheng, 1996). De plus, au-delà de la présence ou de l'absence d'un tissu hématopoïétique, l'existence de lignées cellulaires indépendantes (granulaires et agranulaires) reste également très discutée (Cheng, 1981; Auffret, 1988; Hine, 1999).

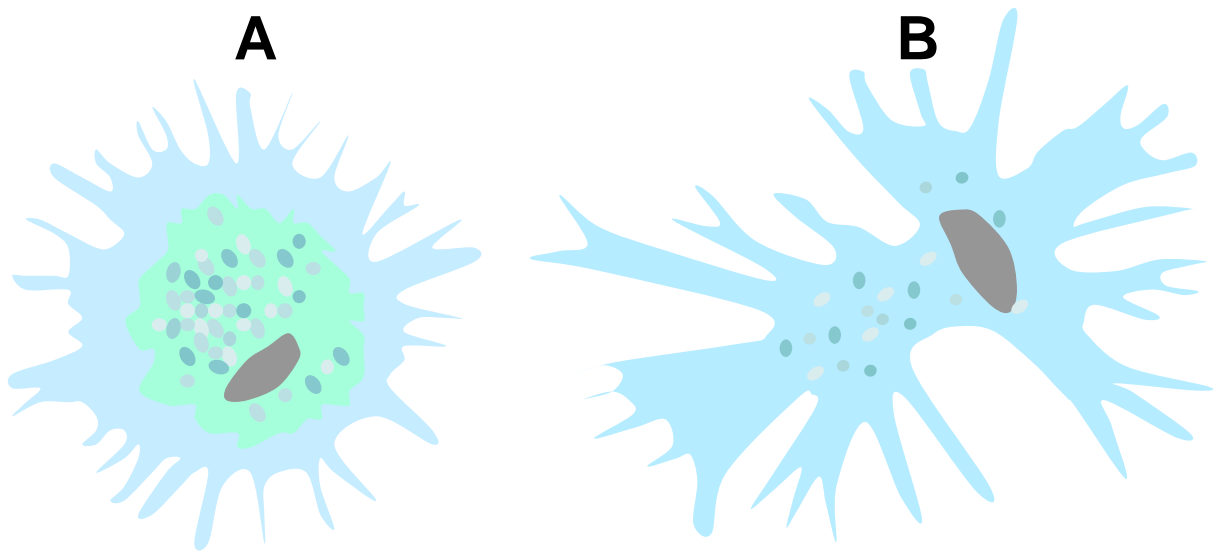


Figure 1: Schémas de granulocytes (A) et de hyalinocytes (B). D'après Soudant et al. (2008).

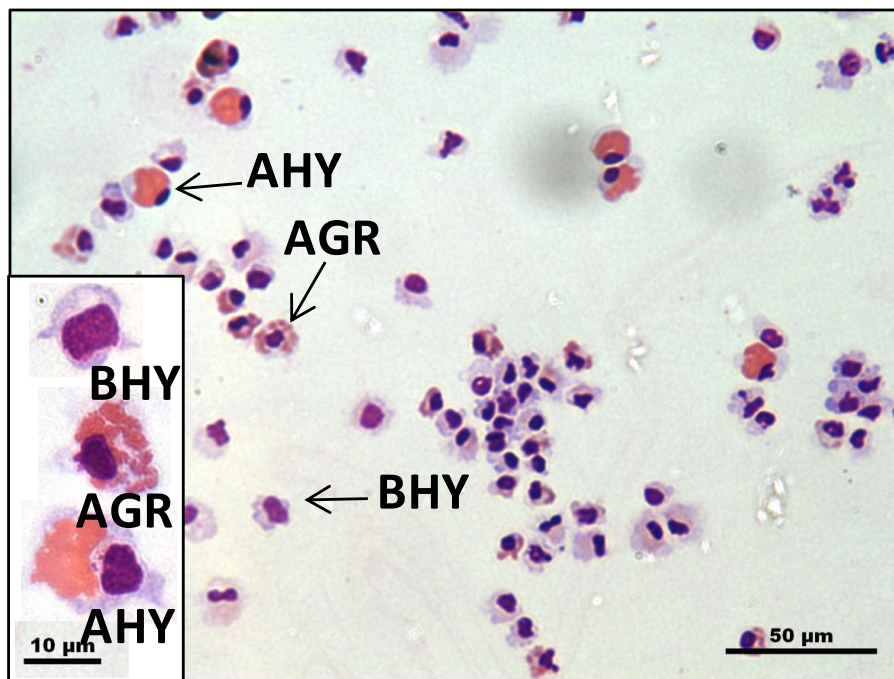


Figure 2: Photographie en microscopie optique d'un frottis d'hémolymphe de coque *Cerastoderma edule* réalisé par cytocentrifugation. Coloration Hemacolor Kit. Grossissement x 40 (x 100 pour l'encart). AHY : hyalinocytes acidophiles ; BHY : hyalinocytes basophiles ; AGR : granulocytes acidophiles.

### **1.3 FONCTIONS DES HEMOCYTES**

Les hémocytes assurent l'immunité cellulaire. Pour cela, ils sont capables de former des pseudopodes, de s'agréger, d'encapsuler ou d'entourer des particules de grande taille (Figure 3), de phagocyter des particules de petite taille et de produire des ERO (Cheng, 1981; Hine, 1999).

#### **1.3.1 PHAGOCYTOSE**

La phagocytose par les hémocytes fait suite à la présence d'un corps étranger (virus, bactéries, particules organiques ou inorganiques, organismes pathogènes ou non) au sein ou au contact de l'organisme. Plusieurs travaux ont montré que la capacité de phagocytose des granulocytes était généralement plus forte que celle des hyalinocytes (Fisher, 1988; Cheng, 1996). La phagocytose se déroule en plusieurs étapes, décrites ci-après d'après (Figure 3):

- reconnaissance de l'élément « non soi »
- fixation du « non soi » sur l'hémocyte et formation de pseudopodes
- internalisation ou endocytose
- dégradation intracellulaire de l'élément phagocyté



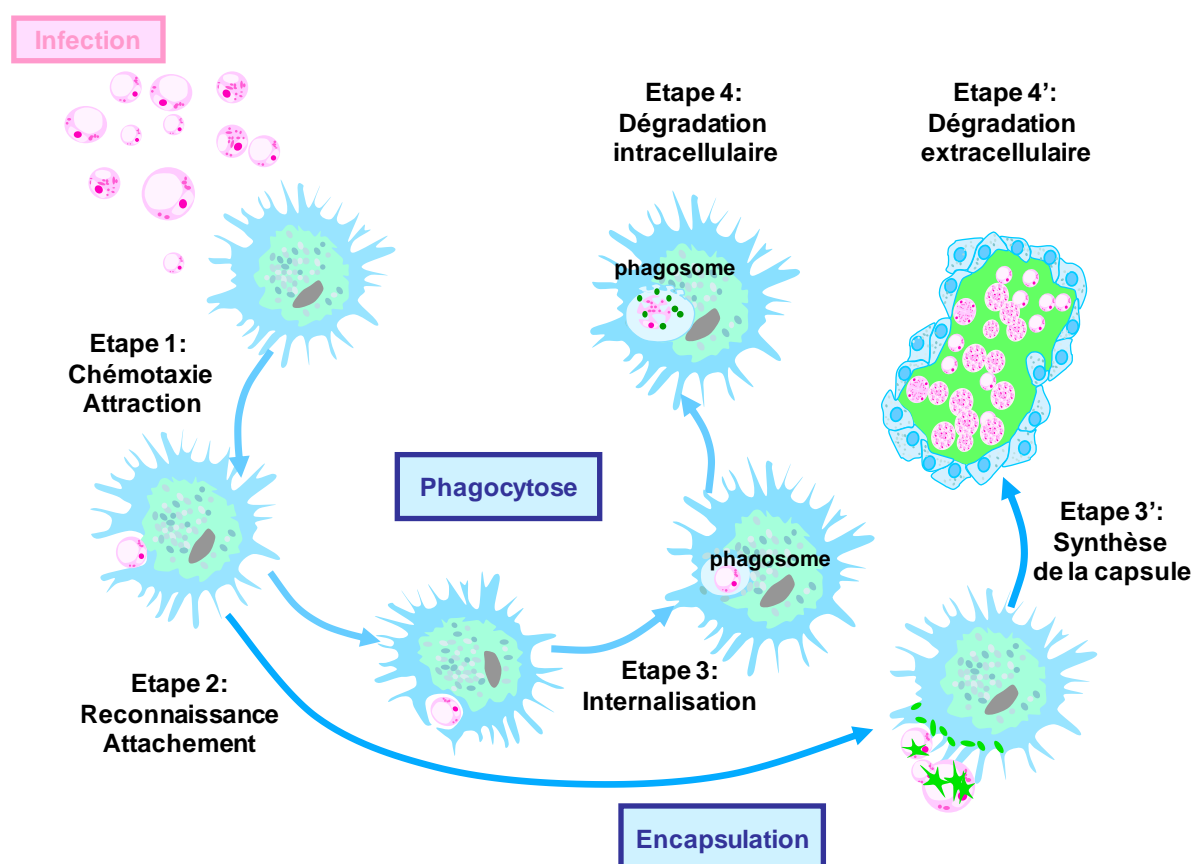


Figure 3: Représentation schématique des processus de phagocytose et d'encapsulation. D'après Soudant et al. (2008).

### 1.3.1.1 RECONNAISSANCE ET FIXATION DU « NON SOI »

Les détails de la reconnaissance de l'élément « non soi » chez les bivalves ne sont pas encore bien connus. Les substances produites par les particules étrangères pourraient agir comme des facteurs chimiotactiques qui favoriseraient le rapprochement entre les particules à phagocyter et les phagocytes. Chez les mollusques marins, la fixation des deux éléments pourrait s'expliquer par la présence de molécules particulières à la surface des hémocytes. En effet, des molécules de reconnaissance, comme les lectines ou les protéines de liaison au LPS (lipopolysaccharides composant la paroi bactérienne), y ont été identifiées.

Plus précisément, les lectines sont des glycoprotéines synthétisées et sécrétées par les hémocytes, capables de se lier à la surface des microorganismes et qui permettent l'agglutination de ces microorganismes, l'opsonisation par liaison à la membrane des hémocytes, et enfin la reconnaissance, quand elles sont liées aux membranes hémocytaires (Chu, 2000) (Figure 4).

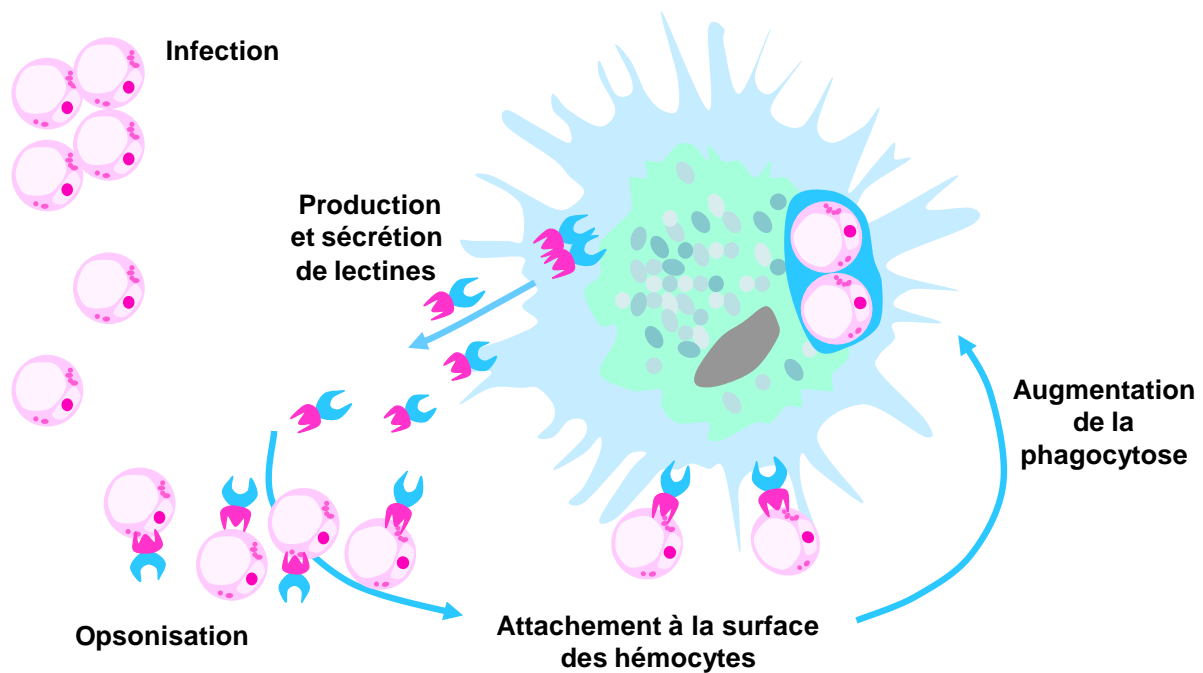


Figure 4: Processus hypothétique du rôle des lectines dans la reconnaissance et l'élimination des parasites par les hémocytes de palourdes. D'après Soudant et al. (2008).

### 1.3.1.2 ENDOCYTOSE

---

L'internalisation est un mécanisme faisant intervenir des remaniements du cytosquelette. Cheng (1981) a proposé trois mécanismes possibles d'internalisation des particules étrangères par les hémocytes de bivalves :

- des filopodes entoureraient les particules, ensuite englobées dans des phagosomes

- les particules seraient englobées dans des vacuoles d'endocytose après adhésion des particules à la surface de la cellule
- les particules pourraient entrer dans les phagosomes par l'intermédiaire de pseudopodes « entonnoirs »

#### **1.3.1.3 DEGRADATION INTRACELLULAIRE**

---

Une fois les particules étrangères phagocytées dans les phagosomes, ceux-ci fusionnent avec les lysosomes pour donner des phagolysosomes où s'effectue leur dégradation par la formation d'ERO (Figure 5) ou par des enzymes lysosomales de type  $\beta$ -glucuronidase, acide phosphatase, alcaline phosphatase, lipase, aminopeptidase ou lysozyme (Bachère et al., 1995; Roch, 1999; Chu, 2000).

#### **1.3.1.4 PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO)**

---

Le terme ERO regroupe principalement : le radical oxygène  $\cdot\text{O}_2$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , le radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$ , l'oxyde nitrique  $\cdot\text{NO}$  et la molécule de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Leur production, ou poussée respiratoire (oxydative burst), est couplée à la phagocytose ou bien fait suite à la stimulation des phagocytes par des produits microbiens (Roch, 1999; Tiscar and Mosca, 2004). Leur production débute par la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde par la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) (Figure 5). L'anion superoxyde est alors converti en peroxyde d'hydrogène par la SOD (superoxyde dismutase) et éventuellement sous la forme de radicaux hydroxyles et oxygènes. Ce phénomène est associé à une augmentation de la consommation en oxygène par les hémocytes (Chu, 2000).

Ces radicaux oxygénés produits sont toxiques et peuvent réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques. La myéloperoxydase permet ainsi, en présence d'ions chlorure, la dismutation du peroxyde d'hydrogène en hypochlorite, molécule très toxique pour les particules ingérées. De même, l'oxyde nitrique  $\cdot\text{NO}$ , produit à partir de L-arginine par la  $\cdot\text{NO}$  synthase (NOS), peut réagir avec l'anion superoxyde et générer du peroxynitrite  $\text{ONOO}^-$ , composé au fort pouvoir microbicide (Ottaviani et al., 1993; Conte and Ottaviani, 1995) (Figure 5).

Ces radicaux sont très instables, très réactifs et hautement microbicides (Babior, 1999) et jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (bactéries, virus, levures et protozoaires). Cependant, ils sont également toxiques pour les cellules de l'hôte, qui possèdent des systèmes enzymatiques pour s'en protéger, comme les enzymes SOD, peroxydases ou catalases.

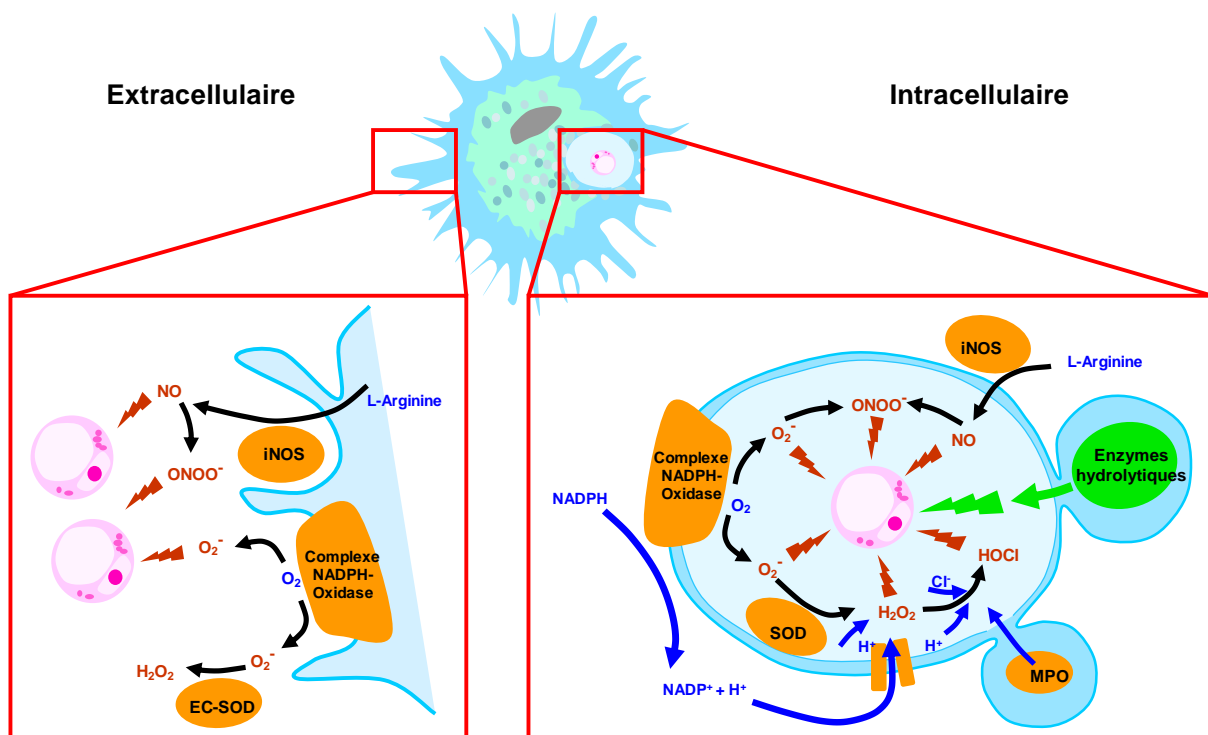


Figure 5: Présentation hypothétique des mécanismes impliqués dans la production des principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, au niveau extracellulaire (gauche) ou dans le phagosome (droite).  $\cdot\text{NO}$ : oxyde nitrique;  $\text{ONOO}^-$ : peroxynitrite;  $\text{O}_2^-$ : anion superoxyde;  $\text{HOCl}$ : hypochlorite; iNOS: oxyde nitrique synthase inducible; SOD: superoxyde dismutase; EC-SOD: superoxyde dismutase extracellulaire; MPO: myéloperoxydase. D'après Soudant et al. (2008).

## 2 LA NEOPLASIE DISSEMINEE

### 2.1 DEFINITION

La néoplasie est une altération de la croissance cellulaire caractérisée par une prolifération incontrôlée, excessive et anormale de cellules, de manière indépendante du schéma normal de croissance défini par les mécanismes de régulation de l'organisme (Sindermann, 1990). La forme de néoplasie étudiée dans la présente thèse, appelée communément « néoplasie disséminée », a été décrite en détail dans la revue d'Elston et al. (1992) et plus récemment dans celle de Barber (2004). Avec la néoplasie gonadique, elle représente l'un des deux types majoritaires de néoplasies malignes qui peuvent affecter les bivalves marins (Barber, 2004). La néoplasie disséminée a eu depuis sa description initiale des dénominations différentes, telles que néoplasie hématopoïétique, sarcome disséminé, ou néoplasie hémique (Yevich and Barszcz, 1977; Elston et al., 1988; Peters, 1988). Toutes ces terminologies étaient basées sur l'origine des cellules cancéreuses, proliférant majoritairement, et en premier lieu, dans le système circulatoire des bivalves (hémolymph), où circulent normalement des hémocytes (Farley, 1969b; Mix, 1983; Balouet et al., 1986). Toutefois, l'origine de ces cellules cancéreuses, appelées cellules néoplasiques, est encore inconnue, notamment en raison du fait que chez les bivalves, l'organe hématopoïétique, à l'origine des hémocytes, est lui-même encore inconnu (Balouet and Poder, 1980; Peters, 1988; Elston et al., 1990). Cependant, ces cellules néoplasiques sont supposées d'origine endogène puisqu'elles présentent le même caryotype que les hémocytes (Reno et al., 1994; Smolarz et al., 2005).

## 2.2 LES CELLULES NEOPLASIQUES

Les cellules néoplasiques, présentent de nombreuses différences avec les hémocytes, en particulier par des altérations de leurs caractères morphologiques (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). Comparées aux hémocytes, les cellules néoplasiques sont plus grosses, moins différenciées, et de forme circulaire pléomorphique anaplastique (Figure 6). Elles présentent également un plus gros noyau hyperchromatique, lui aussi pléomorphique, un ratio volume nucléaire/volume cytoplasmique supérieur. Elles semblent aussi différer fonctionnellement des hémocytes. Comme le montrent les nombreuses figures mitotiques observées en microscopie optique, les cellules néoplasiques sont mitotiquement plus actives que les hémocytes (Mix, 1975).

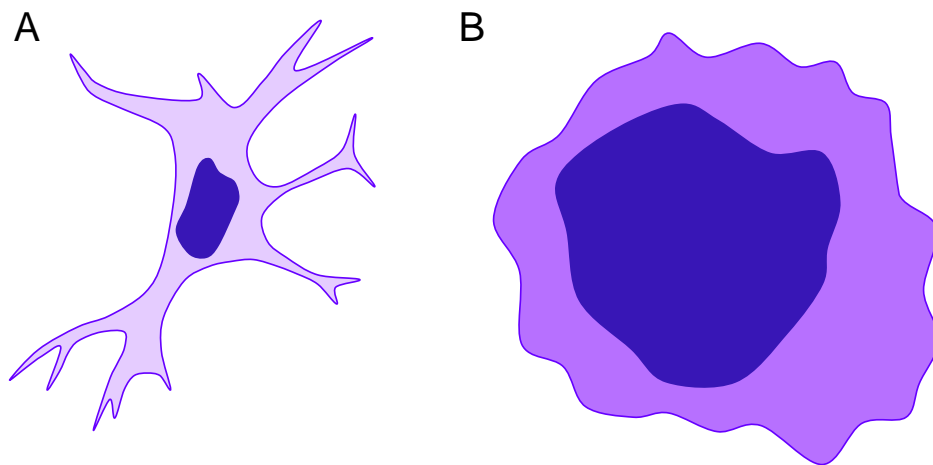


Figure 6: Schémas représentant un hémocyte (A) et une cellule néoplasique (B) de coque *C. edule*, à la même échelle.

---

## **2.3 PATHOLOGIE PROGRESSIVE ET INVASIVE**

La néoplasie disséminée est une pathologie progressive et invasive (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). Avec la progression de la maladie, en raison des taux très élevés de croissance et de multiplication des cellules néoplasiques, leur concentration augmente dans l'hémolymphe. La proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymphe, par rapport aux hémocytes, permet de déterminer des stades d'avancement de la pathologie (Cooper et al., 1982; Barber, 1990a; Brousseau and Baglivo, 1991). Dans les stades les plus avancés, les cellules néoplasiques remplacent totalement les hémocytes dans l'hémolymphe, et envahissent également différents organes, parmi lesquels les branchies ou la glande digestive sont les premiers touchés (Mix, 1983; Elston et al., 1992; Barber, 2004). Dans la plupart des cas, même si une rémission est parfois possible, la maladie mène à la mort des individus affectés (Cooper et al., 1982; Barber, 1990a; Brousseau and Baglivo, 1991). Ce sont ces caractères qui ont mené à classer la néoplasie disséminée dans les néoplasies de type malignes (Sparks, 1985).

---

## **2.4 ETIOLOGIE DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE**

La compréhension de l'étiologie de la néoplasie disséminée a fait l'objet de nombreuses études, mais les facteurs responsables de la maladie n'ont toujours pas été clairement définis (Elston et al., 1992; Barber, 2004). Il a été montré que certains stress, comme la pollution environnementale par exemple, même s'ils n'étaient pas à l'origine de la pathologie, pouvaient dans certains cas favoriser l'apparition et le développement de la maladie (Brown, 1980). Comme dans de nombreuses maladies, l'apparition de la néoplasie disséminée ne semblerait pas être due à un seul facteur, mais serait plutôt la résultante d'interactions complexes entre l'état physiologique de l'individu, les paramètres environnementaux et divers stress.

Le caractère transmissible de la néoplasie disséminée a été démontré, entre individus de la même espèce, chez plusieurs espèces de bivalves (Sunila, 1994; Weinberg et al., 1997; Collins and Mulcahy, 2003), indiquant qu'un agent infectieux, pourrait être impliqué dans la maladie. Ceci est renforcé par l'observation d'apparitions subites de néoplasie disséminée, à des niveaux de prévalence et de mortalité très élevés, dans des populations précédemment reportées comme saines (Farley et al., 1986; McGladdery et al., 2001). Plus précisément, la plupart des études portant sur ce sujet suggèrent fortement une étiologie rétrovirale de la maladie (House et al., 1998; Romalde et al., 2007; AboElkhair et al., 2009).

---

## 2.5 ECOLOGIE DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE

Depuis sa première description par Farley (1969a; 1969b) chez des huîtres (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*) et chez des moules (*Mytilus edulis*), la néoplasie disséminée a été observée dans pas moins de 15 espèces de mollusques (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004), dont les huîtres américaines et plates (*Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis*), les moules (*Mytilus* spp.) et plus particulièrement les myes (*Mya arenaria*) et les coques (*Cerastoderma edule*). Cette maladie n'est pas limitée à un écosystème particulier ou à une région géographique restreinte (Elston et al., 1992; Barber, 2004). La néoplasie disséminée a été mise en cause dans des épisodes de mortalités massives de populations de bivalves (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004).

Chez la coque, *Cerastoderma edule*, la néoplasie disséminée a été décrite pour la première fois en 1982 à Cork Harbour, en Irlande (Twomey and Mulcahy, 1984; 1988), et à peu près à la même période en Bretagne (Aber-Wrach) (Auffret and Poder, 1986; Poder and Auffret, 1986). Plus récemment, cette pathologie a été détectée chez les coques de Galice (Espagne) (Rodriguez et al., 1997; Villalba et al., 2001; Ordas and Figueras, 2005). Chez la mye, le premier épisode de néoplasie disséminée a été reportée par Farley et al. (1986; 1991), en 1983 dans la Baie de Chesapeake, sur la côte Nord-Est des Etats-Unis. Depuis, des observations régulières de myes atteintes de néoplasie disséminée étendent l'aire de



répartition de cette maladie plus au nord, jusqu'au Canada (Nouveau Brunswick et île du Prince Edouard) (Morrison et al., 1993; McGladdery et al., 2001; Delaporte et al., 2008).

Une revue de la littérature montre que la prévalence (pourcentage d'animaux malades) et l'intensité (stade de développement de la maladie) de la néoplasie disséminée peuvent varier selon les années et au cours de l'année (Elston et al., 1992; Barber, 2004). Il n'a pour l'instant pas été possible de définir de tendance claire quant à ce paramètre. Ainsi, chez la coque, en Irlande, une prévalence supérieure a été observée en juin et en novembre (Twomey and Mulcahy, 1988). Chez la mye, plus largement étudiée, la plupart des auteurs ont reporté des variations saisonnières de ces paramètres, mais de nature très variée (Brousseau, 1987; Barber, 1990b; Farley et al., 1991).

Enfin, la néoplasie disséminée semble affecter plus particulièrement certains individus, en fonction de leur âge, de leur sexe et de leur statut reproducteur (Twomey and Mulcahy, 1988; Brousseau and Baglivo, 1994; Ford et al., 1997).

---

## **2.6 NEOPLASIE DISSEMINEE ET IMMUNITE**

L'augmentation de la proportion de cellules dans l'hémolymphe par rapport aux hémocytes, caractérisant la progression de la maladie, est concomitante à une modification des proportions relatives de deux sous-populations d'hémocytes, les hyalinocytes et les granulocytes, avec une diminution de la proportion de hyalinocytes par rapport aux granulocytes (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). Les cellules néoplasiques semblent quant à elles perdre toute capacité d'adhésion et de formation de pseudopodes (Brown et al., 1977; Peters, 1988; Elston et al., 1992). Les conséquences de ce phénomène sur les capacités de phagocytose des cellules néoplasiques ont particulièrement été mises en évidence dans l'étude de Kent et al., (1989). Ces auteurs ont montré (i) que des cellules néoplasiques ne pouvaient pas, ou très peu, phagocyter des levures, et (ii) que les moules présentant un stade très avancé de néoplasie disséminée, avait perdu leur pouvoir

d'épuration de l'eau vis-à-vis des bactéries. Ainsi, avec la progression de la néoplasie disséminée, les capacités de défense immunitaires des bivalves affectés semblent fortement diminuées ; ils deviennent en quelque sorte immuno-déficients. La mort des individus atteints de néoplasie disséminée pourrait donc résulter d'une infection secondaire. Cette hypothèse reste toutefois peu probable étant donné les sévères altérations tissulaires et l'hypoxie de l'hémolymphé causée par la prolifération des cellules néoplasiques, qui semblent à même de mener plus directement à la mort (Mix, 1983; Sunila, 1991).

## **2.7 METHODES DE DIAGNOSTIC : HISTOLOGIE VS. CYTOMETRIE EN FLUX**

Le diagnostic de la néoplasie disséminée a souvent été réalisé par observation en microscopie optique d'une fraction d'hémolymphé (hématocytologie ou histocytologie), et/ou par des observations de coupes histologiques d'organes (histopathologie) (Elston et al., 1992; Barber, 2004). La 1<sup>ère</sup> méthode permet la détection des cellules néoplasiques, d'apparence morphologique particulière, et ainsi d'effectuer un diagnostic de néoplasie disséminée. La 2<sup>nde</sup> méthode permet, elle, d'obtenir des informations supplémentaires concernant le stade de développement de la maladie en étudiant l'invasion des organes par les cellules néoplasiques (Mix, 1983). Cependant, bien que ces méthodes soient toujours couramment utilisées, elles présentent au moins trois inconvénients : i) le nombre limité de cellules analysées, ii) la subjectivité du diagnostic, et iii) le caractère fastidieux et laborieux des phases de préparation et d'observation des échantillons.

Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation de la cytométrie en flux est devenue de plus en plus courante pour diagnostiquer la néoplasie disséminée (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Collins, 1998; da Silva et al., 2005; Delaporte et al., 2008). Contrairement aux méthodes plus classiques, l'utilisation de la cytométrie en flux permet d'analyser une grande quantité de cellules, ainsi qu'une détection rapide et objective des cellules néoplasiques. Cette méthode repose sur le fait que les cellules néoplasiques sont caractérisées par des contenus en ADN anormaux (aneuploïdie), différent de ceux des

cellules « normales » (diploïdes). La cytométrie de flux, en analysant précisément le contenu en ADN des cellules de l'hémolymphe et de leur cycle cellulaire, permet de détecter les cellules néoplasiques. Ainsi, bien qu'elle n'ait été réalisée que sur un faible nombre d'échantillons, l'étude de da Silva et al. (2005) a montré que les diagnostics obtenus par cytométrie en flux, par histopathologie et par hématocytologie étaient similaires. Cette étude a aussi mis en évidence que seule l'analyse par cytométrie en flux permettait la détection de cellules hypoploïdes, suggérant ainsi une sensibilité supérieure de cette méthode par rapport aux deux autres.

Cependant, cet outil ne permet pas de résoudre un problème évoqué de façon récurrente depuis la mise en évidence de la néoplasie disséminée. C'est le problème de l'incertitude de diagnostic et de la possibilité de diagnostics erronés dans le cas d'individus présentant un stade précoce de la maladie. En effet, il est très difficile de discriminer les individus sains des individus présentant de faibles proportions de cellules néoplasiques. Plus particulièrement, l'utilisation de cette méthode pour le diagnostic de néoplasie a soulevé un nouveau problème. Il s'agit de la discrimination entre i) des cellules néoplasiques tétraploïdes ( $4n$ ) et ii) des hémocytes normaux en train de se diviser par mitose, qui ont doublé leur quantité d'ADN, et qui présentent donc également un contenu en ADN tétraploïde ( $2 \times 2n$ ). Une méthode pour se libérer de ce biais potentiel a été suggérée par Delaporte et al. (2008). Il s'agit de ne considérer comme sains que les individus présentant une hémolymphe contenant moins de 5% de cellules tétraploïdes, et comme néoplasiques, ceux présentant une hémolymphe contenant plus de 20% de cellules néoplasiques. Cette méthode a l'avantage de permettre d'obtenir un diagnostic fiable pour les individus extrêmes. Cependant, pour tous les individus dont l'hémolymphe contient entre 5% et 20% de cellules tétraploïdes, l'incertitude persiste. Cette méthode peut ne pas être adaptée aux cas où la plupart des animaux malades présenteraient un stade très peu avancé de la maladie.

## 2.8 CONTENU EN ADN DES CELLULES NEOPLASIQUES

L'utilisation de la cytométrie en flux pour le diagnostic de la néoplasie disséminée permet d'étudier le contenu en ADN des cellules néoplasiques, et d'obtenir ainsi de nouvelles informations pour la compréhension de la maladie. Comme énoncé précédemment, ces études ont montré que les cellules néoplasiques étaient caractérisées par des contenus en ADN anormaux (aneuploïdie), différents de ceux des cellules « normales » (diploïdes). Ces contenus semblent varier en fonction des espèces, des individus, et même au sein d'un même individu (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Collins, 1998; da Silva et al., 2005; Delaporte et al., 2008). Par exemple, les cellules néoplasiques de moules de l'Etat de Washington affectées par la néoplasie disséminée étaient, soit tétraploïdes (4n), soit pentaploïdes (5n), soit les deux en même temps dans un même individu (Moore et al., 1991). Une autre étude a montré que ces cellules pouvaient aussi présenter des contenus en ADN hyperdiploïdes, heptaploïdes ou décaploïdes (Elston et al., 1990). Au contraire, d'autres études ont montré que les cellules néoplasiques de myes *Mya arenaria*, originaires du Maine et de l'île du Prince Edouard étaient presque uniquement tétraploïdes (Reno et al., 1994; Delaporte et al., 2008). Collins (1998) a établi que les coques néoplasiques *C. edule* d'Irlande contenaient à la fois des cellules hypodiploïdes, hyperdiploïdes, triploïdes, tétraploïdes, pentaploïdes et hexaploïdes. Da Silva et al. (2005) ont observé que les coques néoplasiques de Galice contenaient des cellules anormales similaires à celles observées en Irlande, par Collins (1998), à l'exception de celles hexaploïdes.



### 3 LES LIPIDES

Cette partie, non exhaustive, rappelle quelques généralités sur les structures moléculaires des principaux lipides qui ont été étudiés lors de cette thèse. Les connaissances sur le métabolisme et les fonctions principales de ces lipides seront aussi évoquées, en mentionnant ce qui est connu chez les mollusques bivalves lorsque les données existent.

#### 3.1 DEFINITION

Aucune définition précise du terme lipide n'existe étant donné la variété des substances qu'il regroupe. Dans son sens le plus large, il désigne l'ensemble des molécules telles que les huiles, les graisses et les cires, qui partagent les propriétés suivantes :

- Originaires d'animaux ou de plantes vivants ou fossilisés.
- Insolubles ou immiscibles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques comme le chloroforme, l'éther diéthylique, le benzène ou l'acétone.
- Formées principalement de longues chaînes hydrocarbonées, mais pouvant aussi contenir de l'oxygène, du phosphore, du soufre ou de l'azote.

Cette définition inclut une gamme de molécules très diverses, comme les acides gras et leurs dérivés, les caroténoïdes, les terpènes, les stéroïdes et les acides biliaires, qui n'ont que très peu de points communs au niveau structural ou fonctionnel. Une définition plus cohérente du point de vue biologique et fonctionnel a alors été proposée : « les lipides sont les acides gras, leurs dérivés, et les substances qui leur sont reliées, du point de vue de la biosynthèse ou du rôle fonctionnel ».

Les lipides ont des rôles biologiques essentiels : ce sont par excellence des molécules biologiques multifonctionnelles. Les lipides peuvent intervenir aussi bien comme éléments

structuraux dans les membranes cellulaires (phospholipides et stérols), que comme connecteurs permettant l'insertion membranaire de certaines protéines ou comme métabolites particulièrement riches en énergie lorsqu'il s'agit des acides gras, par exemple. Ils sont aussi des précurseurs d'un grand nombre de messagers intra- et extracellulaires (eicosanoïdes, diacyglycérol, phosphoinositides, stéroïdes, céramides, ...).

---

### **3.2 LIPIDES MEMBRANAIRES VS. LIPIDES DE RESERVE**

En fonction de leur affinité pour certains solvants en chromatographie liquide, les lipides peuvent être subdivisés en deux grandes classes : les lipides neutres et les lipides polaires (Figure 7). Cette subdivision, bien qu'assez imprécise, est très largement utilisée dans la littérature, dans la mesure où elle se retrouve lors des séparations méthodologiques (bien qu'il y ait à ce sujet une certaine confusion entre la polarité des composés eux-mêmes et celle des solvants utilisés pour leur séparation). Il a aussi été proposé d'utiliser, à la place des termes lipides neutres et polaires, les termes lipides simples et lipides complexes (les premiers générant, par hydrolyse, au plus deux constituants primaires par mole, les seconds trois (ou plus) constituants primaires par mole), ou bien les termes lipides de réserve et lipides membranaires. A l'exception des stérols, qui sont considérés comme des lipides simples neutres, mais localisés dans les membranes cellulaires, on observe une très bonne adéquation entre les différentes terminologies (Figure 7).

Dans la présente thèse, les lipides ont été différenciés en lipides de réserves et lipides membranaires. En effet, ces termes ont semblé être les plus adéquats, puisqu'ils reflètent une réalité fonctionnelle. Les triglycérides peuvent être considérés comme les représentants essentiels des lipides de réserve, mais on peut également y trouver des diglycérides, des monoglycérides, des esters de stérols ou d'alcools gras (cires), des alcools gras et des acides gras libres. Parmi les lipides membranaires, on trouve des sphingolipides, des glycolipides, des phospholipides et des stérols.

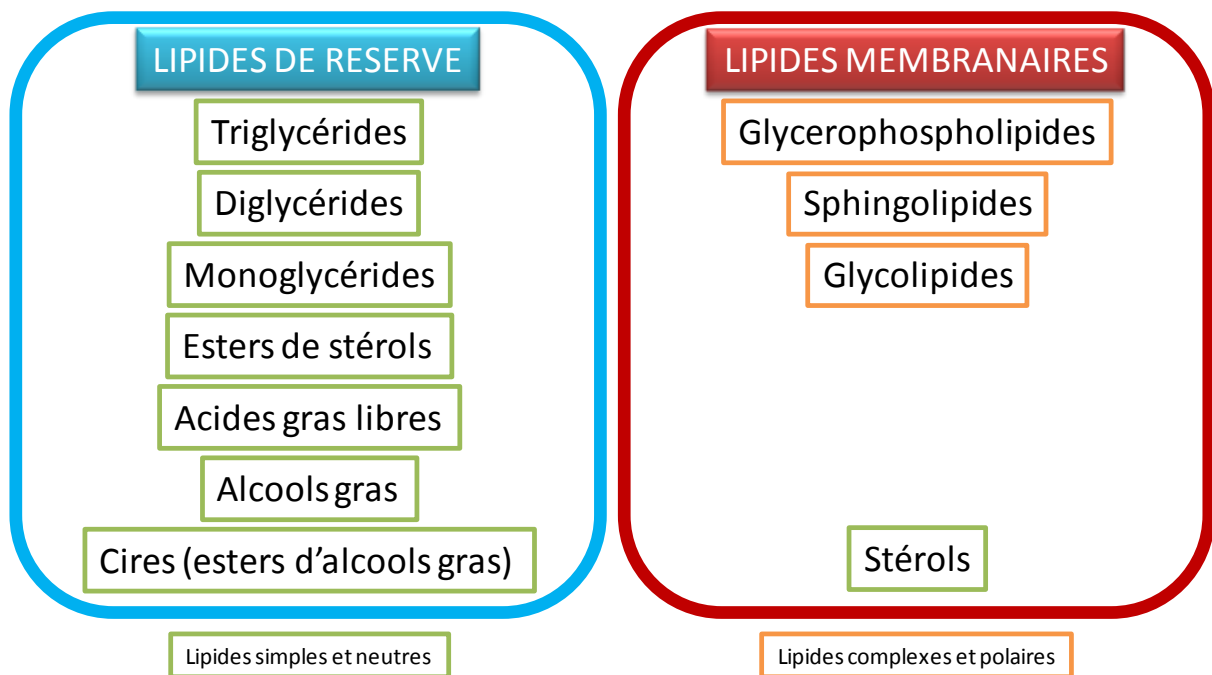


Figure 7: Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires.

### 3.3 LIPIDES MEMBRANAIRES ET MEMBRANES CELLULAIRES

Les lipides membranaires sont caractérisés par leur caractère amphiphile. En effet, ils possèdent une tête polaire, relativement importante et qui présente un caractère hydrophile, reliée à des chaînes aliphatiques hydrophobes. De part leur nature amphiphile, ces molécules ont tendance à s'agréger spontanément, de façon à mettre leurs têtes polaires en contact avec l'eau et en isoler leurs chaînes hydrophobes. Cela provoque la formation de micelles ou de « bicouches lipidiques » (Figure 8). Les lipides membranaires, organisés en bicouches lipidiques, représentent les constituants majoritaires, l'ossature, des membranes cellulaires dans lesquelles sont insérées des protéines (Figure 9).



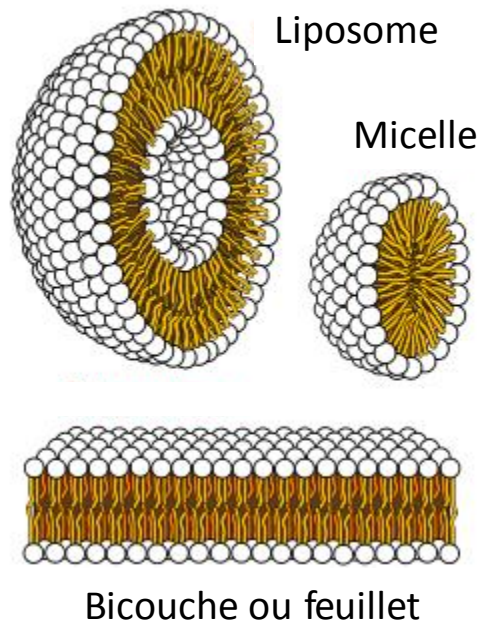


Figure 8: Différents modes d'arrangement spontané de molécules lipidiques amphiphiles en environnement aqueux : liposome, micelle et bicouche ou feuillet.

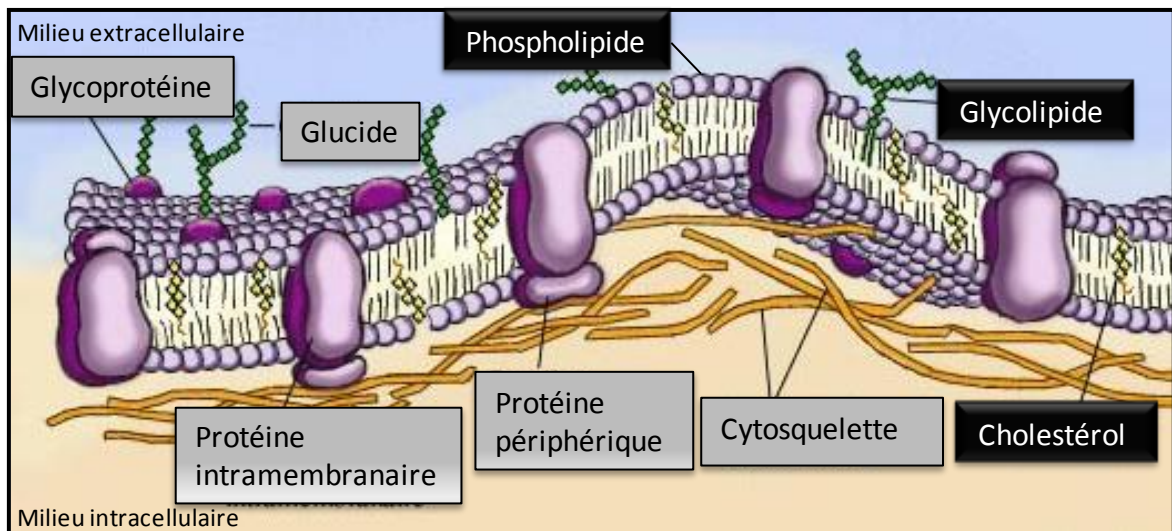


Figure 9: Eléments structuraux d'une membrane cellulaire

### 3.4 STRUCTURE DES LIPIDES MEMBRANAIRES

Différents types de lipides membranaires existent : les glycérophospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols. Les glycolipides, qui sont généralement des composants minoritaires chez les bivalves marins, ne seront pas abordés ici. Les glycérophospholipides ainsi que les représentants majoritaires des sphingolipides dans les membranes cellulaires animales, les sphingophospholipides, sont constitués d'acides gras reliés à une tête polaire formée par un groupement phosphate et sont regroupés sous le terme commun de phospholipides.

#### 3.4.1 ACIDES GRAS

Les acides gras sont généralement constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire, possédant un groupement carboxyle ( $-\text{COOH}$ ). Ils se distinguent par la longueur de leur chaîne et par le nombre et la position des insaturations présentes. Dans ce travail, ils sont identifiés par la formule  $\text{C:Xn-Y}$  où C est le nombre de carbones, X le nombre de doubles liaisons et Y la position de la première double liaison comptée à partir du méthyle terminal. Les doubles liaisons sont supposées être de configuration *cis* et se succéder, en alternance avec un groupement méthyle  $\text{CH}_2$ . En fonction du nombre d'insaturations qu'ils comportent, les acides gras peuvent être classés en trois catégories (Figure 10):

Acides gras saturés (AGS), comme le 16:0

Acides gras monoinsaturés (AGMI), comme le 18:1n-9

Acides gras polyinsaturés (AGPI), comme le 20:4n-6

Chez les bivalves, d'autres acides gras, dits particuliers, existent. Il s'agit des acides gras dits « non-methylene-interrupted » (NMI) et des acides gras branchés. Les premiers se

distinguent par la présence de plus d'un groupement méthyle entre chaque double liaison (Figure 11). Les seconds sont caractérisés par le branchement d'un groupement méthyle sur un carbone de la chaîne : en position iso ou anteiso (Figure 12).

Les propriétés physiques et chimiques des acides gras changent selon la longueur, le nombre et la disposition des doubles liaisons. Le point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne et diminue avec le nombre de doubles liaisons. Ces deux paramètres sont encore considérés comme pouvant être déterminants pour la fluidité des membranes biologiques.

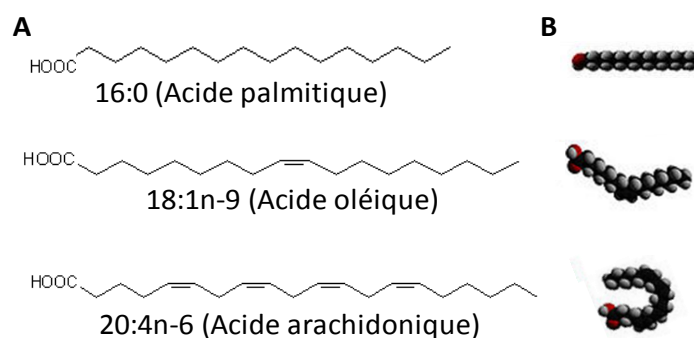


Figure 10: Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ».

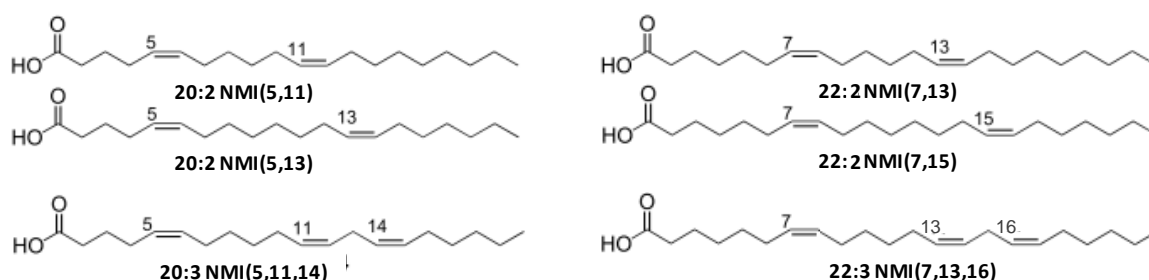


Figure 11: Structure des acides gras NMI chez les mollusques bivalves. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de chacune des doubles liaisons, comptée à partir de la fonction acide.

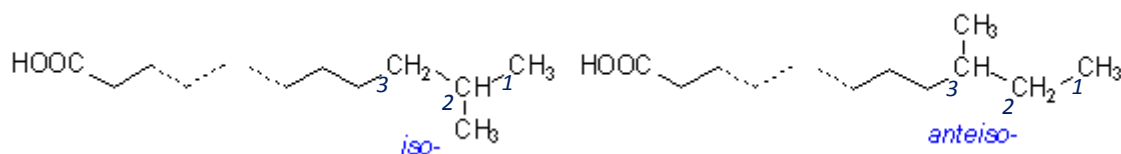


Figure 12: Structure des acides gras branchés de forme « iso » et « anteiso ».

### 3.4.2 CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

L'ensemble des acides gras décrits ci-dessus interviennent rarement sous forme libre et sont en fait constitutifs de molécules plus importantes dans lesquelles ils jouent le rôle de partie hydrophobe. Dans le cas des phospholipides, un ou plusieurs acides gras sont liés :

- dans le cas des glycérophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison ester à un alcool, le glycérol (il existe également des cas où la liaison est une liaison éther ou vinyl-éther)
- dans le cas des sphingophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison amide à une base azotée à longue chaîne (amine aliphatique ayant deux ou trois groupements hydroxyles), principalement la sphingosine

Ces composés sont ensuite reliés à une tête polaire, composée d'un groupement phosphate (acide phosphorique) lié ou non à d'autres structures chimiques variées. Ces phospholipides membranaires se distribuent ainsi en plusieurs classes, à chaque tête polaire correspondant une classe de phospholipides. Les principales classes de glycérophospholipides et de sphingolipides sont représentées dans la Figure 13.

## Revue bibliographique

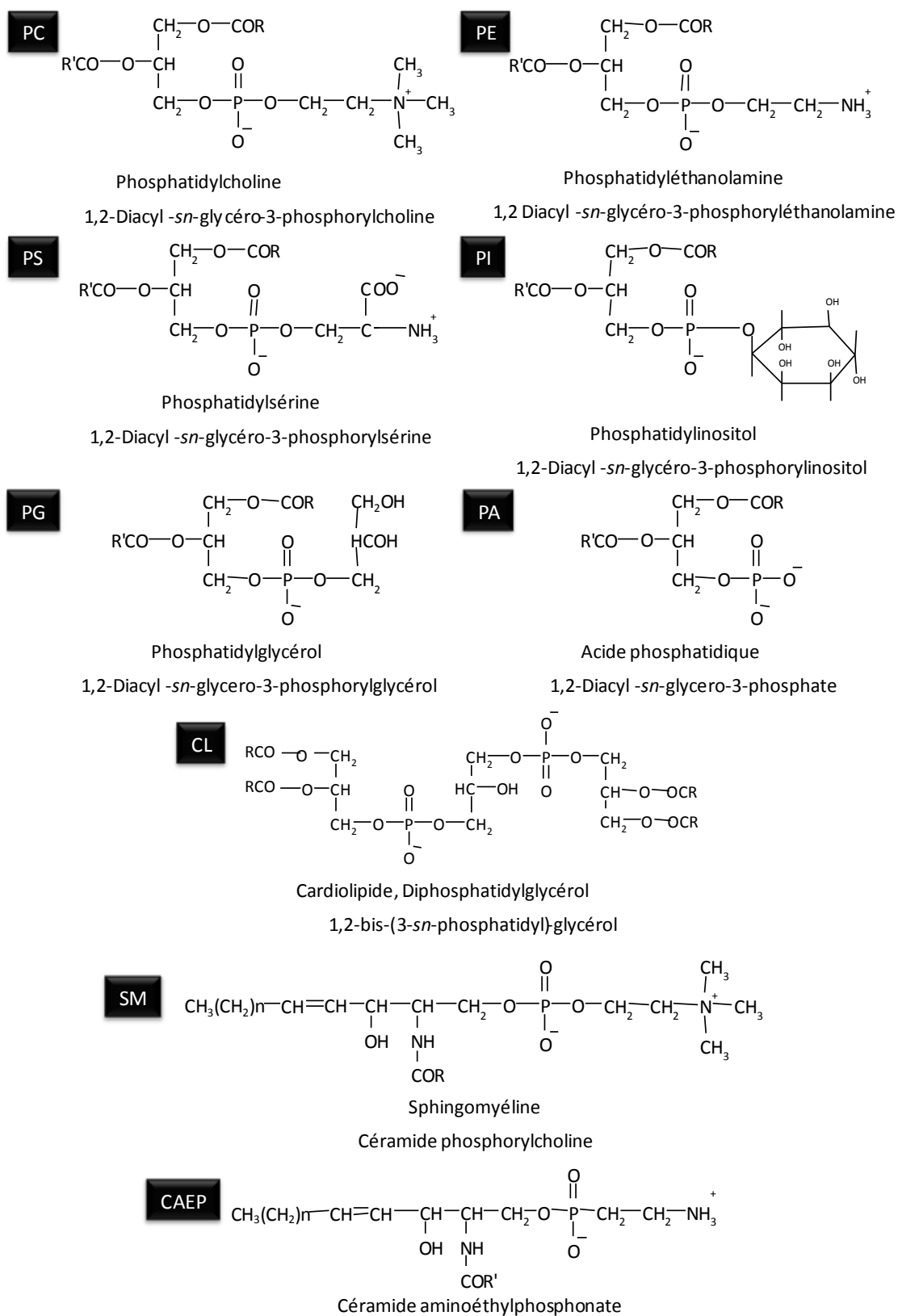
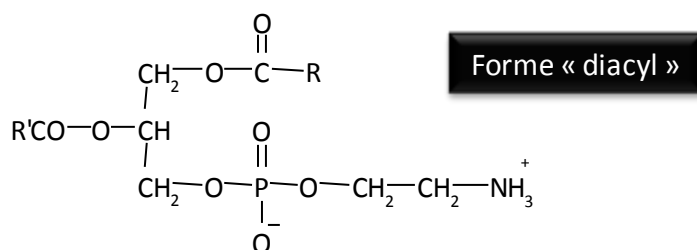


Figure 13: Structure des principaux phospholipides

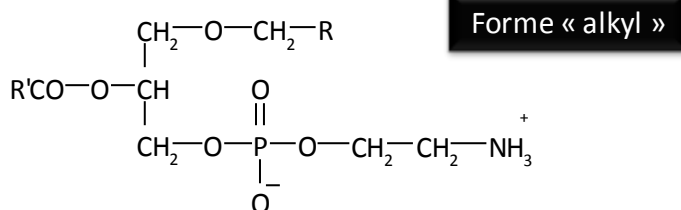
### 3.4.3 SOUS-CLASSES DE GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES

Les glycérophospholipides sont le plus souvent des diacylglycérophospholipides : c'est à dire que chimiquement, deux acides gras sont liés en position *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol par une fonction ester (Figure 14). Le symbole *sn* (pour *stereospecific numbering*) désigne par convention les carbones du glycérol, numérotés 1, 2, 3 de haut en bas sur une projection de Fischer où le second hydroxyle est placé à gauche. Cette forme « diacyl » est la plus courante chez les mammifères. Cependant, certains phospholipides contiennent une liaison éther à la place d'une liaison ester en *sn*-1. Il existe 2 types de liaison éther de la chaîne aliphatique : celle avec un groupe alkyl est appelée alkyl-éther et regroupe la famille des alkylacylglycerophospholipides (forme « alkyl ») (Figure 14) et celle avec un groupe alk-1-enyl est appelée vinyl-éther. Les phospholipides avec une liaison vinyl-éther sont regroupés sous le terme d'alk-1-enylglycerophospholipides ou, plus généralement, de « plasmalogènes » (Figure 14). Il existe également des lysoacylglycérophospholipides, ne présentant qu'une seule chaîne aliphatique : un acide gras estérifié en position *sn*-1 du glycérol (Figure 14).



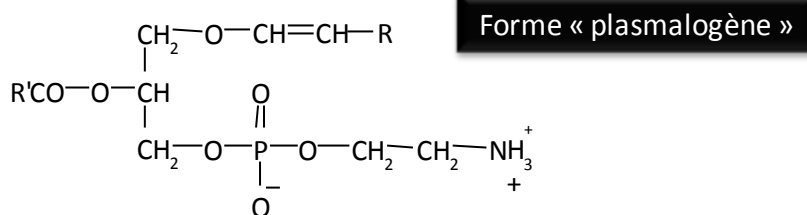
Forme « diacyl »

1acyl -2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



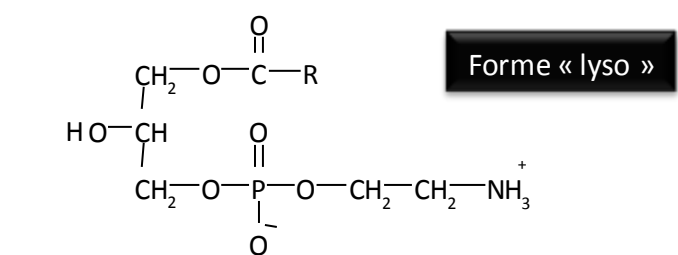
Forme « alkyl »

1alkyl-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



Forme « plasmalogène »

1alkenyl-2acyl-glycéro-3-phosphoéthanolamine



Forme « lyso »

1acyl -2lyso-glycéro-3-phosphoéthanolamine

Figure 14: Structure des différentes sous-classes de la phosphatidyléthanolamine

### 3.5 COMPOSITIONS LIPIDIQUES MEMBRANAIRES

#### 3.5.1 COMPOSITION EN CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

La composition relative moyenne des classes de phospholipides membranaires chez les mammifères est spécifique des organes et/ou des fractions subcellulaires. Les principales classes de phospholipides, PC, PE, PI et PS observées chez les mammifères sont retrouvées chez les mollusques. Néanmoins, il existe des variations selon les espèces, au niveau de l'individu entier, et au niveau des organes différenciés (Vaskovsky, 1989; Kostetsky and Velansky, 2009) (Table 1, Table 2). Les facteurs qui influencent la composition en phospholipides peuvent être endogènes (sexe, reproduction) ou exogènes (salinité, température, saison, nutrition) (Vaskovsky, 1989).

Contrairement aux mammifères et aux poissons, la sphingomyéline n'existe pas chez les bivalves à quelques exceptions près (Sargent, 1989). Cependant, la présence d'autres sphingolipides, notamment de CAEP a été mise en évidence chez beaucoup d'espèces d'invertébrés (Joseph, 1982; Vaskovsky, 1989). La structure du CAEP diffère de celle de la sphingomyéline par la nature sa tête polaire (éthanolamine au lieu de sérine), et la nature de la liaison avec l'acide gras (O-P-C au lieu de O-P-O). Ce phosphonolipide a été mis en évidence pour la première fois chez les bivalves par Matsubara (Matsubara and Hayashi, 1973) dans *C. gigas*. Selon la littérature, les proportions de CAEP retrouvées chez les invertébrés varient de 6 % du total des phospholipides chez l'ormeau *Haliotis midae* (de Koning, 1966) à 20,2 % dans les érythrocytes de *Scarpharca broughtoni* (Chelomin and Zhukova, 1981). Récemment, une étude a mis en évidence des variations importantes de teneur en CAEP en fonction des espèces et des tissus étudiés, les plus fortes étant observées dans les branchies et les muscles de la moule *Crenomytilus grayanus* (16.8% dans les deux organes) (Kostetsky and Velansky, 2009). On suppose que ce phosphonosphingolipide



remplace la sphingomyéline chez les invertébrés, même si certains mollusques semblent posséder les deux (Vaskovsky, 1989).

Table 1: Composition relative des phospholipides de mollusques. Extrait de Vaskovsky (1989)<sup>1</sup>.

Espèces de mollusques	PC	PE	PS	PI	SM	PG + CL	PA	CAEP	Autres
<i>Haliotis midae</i>	41	32	5	5	1	10		6	
<i>Neptunea constricta</i>	35,8	31,6	8,8	3,7	-	1,5	+	11,3	3,3
<i>Mytilus platensis</i>	40,8	18,8	6,3	6,3		11,8			9,2
<i>Modiolus difficilis</i>	24,6	27,5	8,5	5,3		2,4		15,8	13,3
<i>Callista brevisiphonata</i>	31,2	34,1	11,9	5,3		1,7	+	12,2	1,9
<i>Mesodesma mactroides</i>	51,5	11,7	11,2		5,5	5,6			11,5
<i>Octopus vulgaris</i>	42	30	5	4	3	3		13	13
<i>Octopus sp.</i>	39,4	33,5	6,0		9,3	1,2	-	6,8	3,2

Table 2: Composition relative en phospholipides des organes de mollusques Extrait de Vaskovsky (1989)<sup>1</sup>.

Espèces	Organes	PC	PE	PS	PI	SM	CL	Autres
<i>Haliotis corrugata</i>	Muscle	40,4	26,9	9,9	4,4	-	0,6	10
<i>Hinnites giganteum</i>	Muscle	35,4	25,6	11,9	5,0	-	1,4	17,3
<i>Littorina S. rudis</i>	Glande digestive	48,1	30,7	1,6	11,5	6,5	1,4	
<i>Busycon canaliculatum</i>	Cartilage	25,7	17,4	23,3		6,3		27,3
<i>Loligo pealii</i>	Cartilage	25,2	15,8	5,8		2,7		50,1
<i>Mytilus platensis</i>	Gonades	45,9	20,3		4,9	4,5	9,5	9,8
<i>Aplysia kurodai</i>	Ganglion	51,4	27,7		9,5	Tr.		11,4
	Fibre	44,6	29,6		12,4	Tr.		13,4
<i>Mytilus edulis</i>	Ganglion cérébroïde	21,2	27,7			17,8		22,3
	Ganglion pédieux	22,5	23,6			18,2		23,5
	Ganglion viscéral	21,6	23,0			14,7		27,7
<i>Loligo pealii</i>	Axone géant	52	27	7	2	12		1,0
<i>Octopus sp.</i>	Ganglion optique	52,7	16,8	22,8	5,6	-	1,3	1,5
	Ganglion cérébroïde	43,7	27,5	17,0	5,0	3,2	2,1	1,3
<i>Ommastrephes pacificus</i>	Ganglion optique	49,0	29,3	12,8	4,6	4,6	2,3	1,3
	Ganglion cérébroïde	36,3	30,4	17,3	3,5	3,5	3,8	2,5

<sup>1</sup> PC : glycérophosphatidylcholine, PE : glycérophosphatidyléthanolamine, PS : glycérophosphatidylsérine, PI : glycérophosphatidylinositol, SM : sphingomyéline, PG : phosphatidylglycérol, CL : cardiolipide, PA : acide phosphatidique, CAEP : céramide aminoéthylphosphonate.

### 3.5.2 COMPOSITION EN SOUS-CLASSES DE GLYCEROPHOSPHOLIPIDES

Chez les mammifères, les formes 1-alkyl se rencontrent généralement dans la PC et les formes 1-alkényl dans la PE (Paltauf, 1983b). Ces éther-phospholipides sont présents en quantité relativement abondante dans certains tissus. Chez l'humain, la plus forte proportion de la forme plasmalogène au sein de la PE (76%) a été reportée dans la membrane plasmique de cellules immunitaires (MacDonald and Sprecher, 1989). La forme éthanolamine plasmalogène est aussi importante dans les cellules de tissus cruciaux tels que les érythrocytes, les plaquettes ou le cerveau, où elle représente 40 à 60 % de la PE (Scherrer and Gross, 1989; Nagan and Zoeller, 2001). Au niveau subcellulaire, les plasmalogènes seraient plutôt concentrés dans la membrane plasmique, mais ils ont aussi été mis en évidence dans le réticulum endoplasmique, dans les membranes externe et interne des mitochondries et dans la membrane du noyau (Daum, 1985; Wolff et al., 1987).

Si on considère l'ensemble des phospholipides d'un individu, les mollusques se caractérisent par des proportions de plasmalogènes très importantes, souvent supérieures à celles rencontrées dans les érythrocytes ou le cerveau des mammifères (Dembitsky, 1979; Joseph, 1982; Chapelle, 1987; Sargent, 1989; Vaskovsky, 1989; Kraffe et al., 2004; Hanuš et al., 2009). Ces plasmalogènes sont trouvés majoritairement dans la PE et dans une moindre mesure dans la PC. Ils sont également importants dans la PS chez les mollusques, qui sont les seuls organismes à en contenir (Vaskovsky, 1989) (Table 3). Du point de vue cellulaire, de fortes proportions de formes plasmalogènes dans ces classes de phospholipides ont été trouvées dans les membranes d'érythrocytes de *Scapharca broughtoni* (Chelomin and Zhukova, 1981) et dans les branchies de bivalves (Chapelle, 1987; Kraffe et al., 2004).

A notre connaissance, seulement deux études ont analysé l'existence des alkylacylglycerophospholipides dans les différentes classes de phospholipides de bivalves. Chez *C. gigas*, la sous-classe des alkylacylglycerophospholipides a été seulement observée dans la PC et la PE (Koizumi et al., 1990). Au contraire, l'étude de huit espèces de bivalves a permis à Hanuš et al. (2009) de l'observer également dans la PS, où elle compterait pour 20%

de cette classe. Les proportions observées de cette sous-classe étaient de 10% et 30% au sein de la PC et de 7% et 10% au sein de la PE, respectivement pour les études de Koizumi et al. (1990) et de Hanuš et al. (2009).

Table 3: Proportions de plasmalogènes dans les lipides polaires des mollusques marins (en % de la classe ou des phospholipides totaux). Extrait de Vaskovsky (1989).

	Phosphatidyl choline	Phosphatidyl éthanolamine	Phosphatidyl serine	Phospholipides Totaux
<i>Anadana broughtoni</i>	9,0	72,7	53,8	33,7
<i>Arca boucardi</i>	10,0	77,4	36,0	22,7
<i>Callista brevisiphonata</i>	-	85,7	37,8	31,1
<i>Crassostrea gigastea</i>	6,7	81,1	60,5	33,8
<i>Chlamys farrari</i>	2,1	77,3	38,3	27,4
<i>Glycymeris yessoensis</i>	2,7	85,7	77,2	38,0
<i>Mactra sulcataria</i>	-	67,0	51,9	22,9
<i>Merceneria stimpsoni</i>	3,2	68,9	48,5	36,3
<i>Modiolus difficilis</i>	4,4	80,7	75,0	39,7
<i>Rapana thomasi</i>	14,8	74,2	56,0	34,8
<i>Peronidia venulosa</i>	2,4	63,5	50,0	28,5
<i>Patinopecten yessoensis</i>	5,1	66,7	29,0	31,3
<i>Spisula sachalinensis</i>	10,0	72,9	46,3	33,3
<i>Swiftopecten swifti</i>	9,7	66,0	28,9	26,0
<b>Moyenne</b>	6,7	74,3	49,2	31,4
<i>Erythrocytes de S. broughtoni</i>	16,9	90	89,3	47,6

## 3.6 BIOSYNTHESE DES LIPIDES MEMBRANAIRES

### 3.6.1 BIOSYNTHESE DES AG

La synthèse des acides gras commence par la carboxylation de l'acétyl Co-enzyme A en malonyl CoA catalysée par l'acétyl CoA carboxylase (ACC). Une molécule d'acide palmitique (C16:0) est formée par condensation d'une molécule d'acétyl CoA et de 7 molécules de malonyl. Ce processus est catalysé par un complexe multi-enzymatique : l'acide gras synthétase (fatty acid synthetase, FAS) (Figure 15).

L'acide palmitique (C16:0) est le précurseur des autres acides gras par élongation et désaturation. L'élongation se fait par ajout d'une paire de carbones à partir de la fonction carboxyle et les enzymes correspondantes sont localisées dans les mitochondries. Les désaturations s'effectuent dans le réticulum endoplasmique. La première double liaison est mise en place entre le 9<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> atome de carbone (action d'une  $\Delta 9$  désaturase). Le 18:1n-7 et le 16:1n-5 peuvent être ainsi obtenus à partir du 18:0 et du 16:0 (Figure 16). Seuls les végétaux possèdent les enzymes  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases permettant la synthèse du 18:2n-6 et du 18:3n-3.

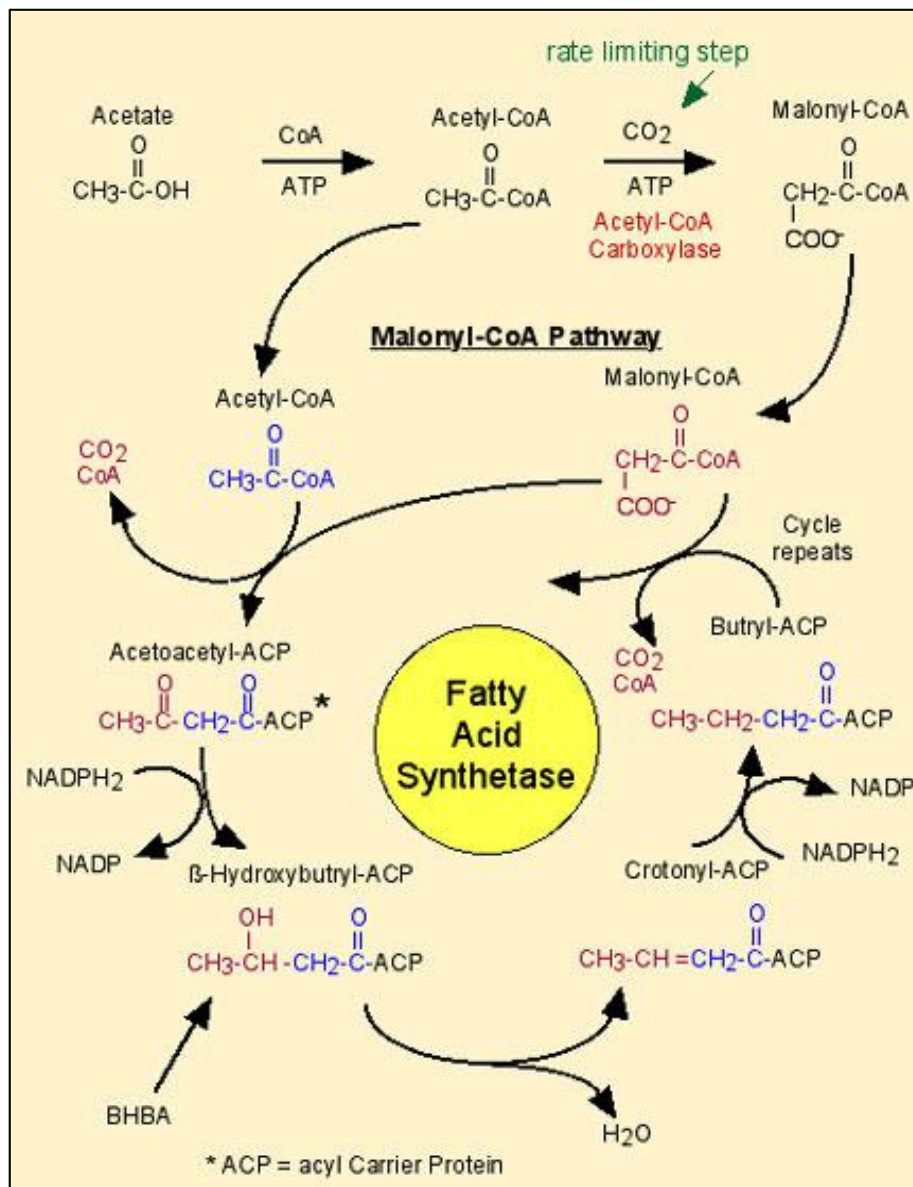


Figure 15: Biosynthèse de l'acide palmitique 16:0

### **3.6.1.1 BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS CHEZ LES BIVALVES**

---

Compte tenu de leur équipement enzymatique, les plantes supérieures ne biosynthétisent majoritairement que jusqu'au 18:2n-6 et 18:3n-3 (Figure 16). Les animaux terrestres peuvent désaturer et élonguer ces précurseurs essentiels, points de départ des séries d'acides gras en n-6 et n-3, constituants majeurs des membranes ou précurseurs de substances régulatrices des fonctions cellulaires. En ce qui concerne la série en n-9, synthétisée à partir du 18:1n-9, celle-ci est considérée généralement comme une voie de compensation qui n'est visible qu'en cas de forte carence alimentaire (Tocher et al., 1995). A la différence des végétaux supérieurs, les microalgues marines, nourriture de base des animaux filtreurs que sont les bivalves, fabriquent les acides gras 18:2n-6 et 18:3n-3, mais aussi l'ensemble des acides gras à longues chaînes des séries n-6 et n-3, ces derniers étant généralement prépondérants. En revanche, la majorité des espèces animales marines ne sont pas ou peu capables de bioconvertir le 18:2n-6 et le 18:3n-3 alimentaires qu'il s'agisse des poissons (Owen et al., 1975; Tocher et al., 1989), des crustacés (Kanazawa et al., 1979) ou des mollusques (De Moreno, 1980; Waldock and Holland, 1984). De ce fait, les AGPI 20:4n-6, 20:5n-3 et 22:6n-3 sont considérés comme des acides gras essentiels pour la survie, la croissance et la reproduction des espèces marines (Trider and Castell, 1980; Uki et al., 1986).

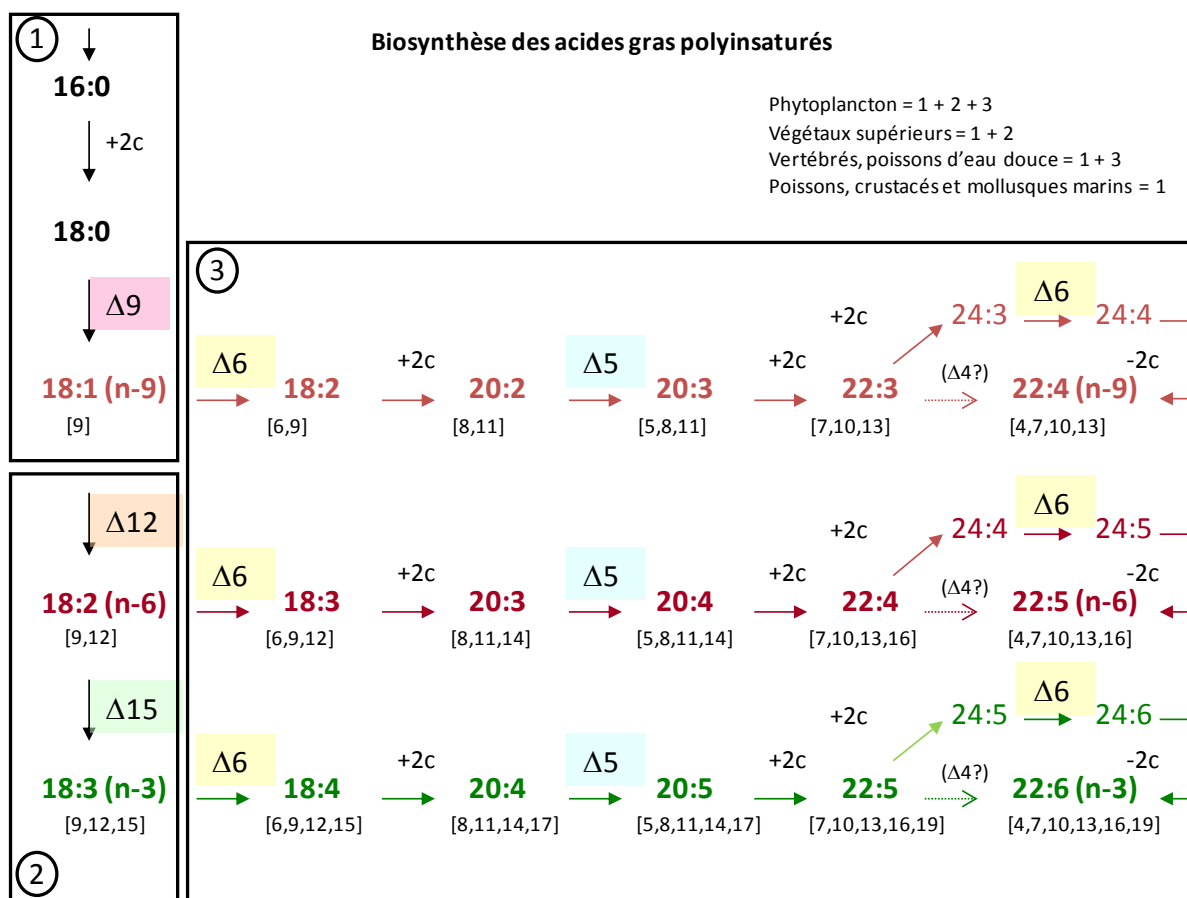


Figure 16: Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Les chiffres entre [] indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide.

### 3.6.1.2 AG PARTICULIERS BIOSYNTHETISES CHEZ LES BIVALVES

Il existe cependant chez les mollusques des capacités à biosynthétiser certains AGPI particuliers : les acides gras dits « non-methylene-interrupted » (NMI) (Zhukova, 1986; 1991). Ces AGPI sont obtenus à partir du 16:0 et du 18:0 après plusieurs étapes d'élongation et deux étapes de désaturation en  $\Delta 9$  puis en  $\Delta 5$  (Figure 17). Cependant, on peut souligner que cette capacité de désaturation en  $\Delta 5$  se limite à ces acides gras NMI puisque la biosynthèse de 20:4n-6 et de 20:5n-3 n'existe pas ou est considérée comme très peu active chez ces mollusques (De Moreno et al., 1976; Waldock and Holland, 1984). Un autre acide gras particulier, le 22:4n-9*trans* $\Delta 13$  est important chez les Pectinidés (Soudant et al., 1995; Soudant et al., 1996; 1997; Marty et al., 1999). Il serait biosynthétisé par l'animal mais les intermédiaires de biosynthèse ne sont pas encore tous connus (Kraffe, 2003; Kraffe et al., 2006). Enfin, un AGMI particulier, le 20:1n-11 a été également suggéré comme pouvant être biosynthétisé *de novo* à partir du 20:0, par l'action d'une  $\Delta 9$  désaturase (Kraffe et al., 2004) (Figure 17).

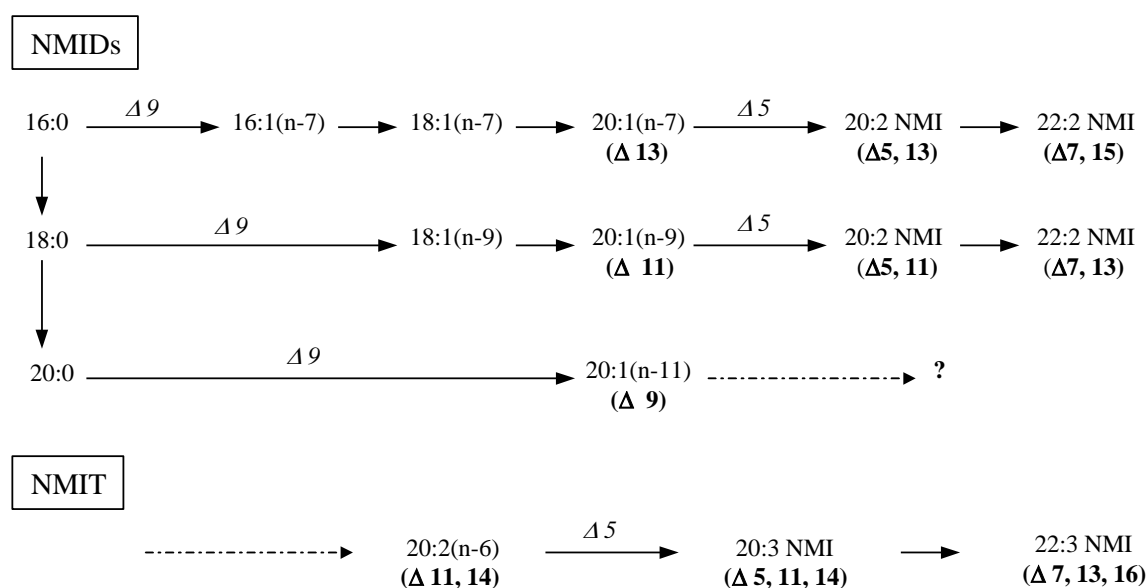


Figure 17: Biosynthèse des AG NMI et du 20:1n-11 (Kraffe, 2003)





### 3.6.2 BIOSYNTHÈSE DES PHOSPHOLIPIDES

#### 3.6.2.1 BIOSYNTHÈSE DES DIACYLGLYCEROPHOSPHOLIPIDES

Le point de départ de cette biosynthèse est le glycérol 3-phosphate formé essentiellement par réduction du dihydroxyacétone phosphate et, à un moindre degré, par phosphorylation du glycérol (Hatch and Choy, 2004) (Figure 18). L'acide phosphatidique (diacylglycérol 3-phosphate) est obtenu par deux acylations successives catalysées par une glycérol phosphate acyl transférase. La chaîne en position *sn*-1 est généralement saturée et celle en *sn*-2 insaturée. L'acide phosphatidique est un intermédiaire commun à la synthèse des phosphoglycérides et des triglycérides. Dans la synthèse des triglycérides, l'acide phosphatidique est hydrolysé pour donner du diacylglycérol, pouvant être réacylé en triglycérides par une diacylglycéride acyl transférase.

La biosynthèse *de novo* de la PI commence par la formation de CDP-diacylglycérol (cytidine diphosphodiacylglycérol). Cette forme activée réagit avec l'inositol pour former la PI. La PC et la PE peuvent être synthétisées par une voie qui utilise la choline (alimentaire) et l'éthanolamine. La PS provient d'une réaction directe entre la PE ou la PC et la sérine. La PE peut être reformée par décarboxylation de la PS. La PC peut être également formée à partir de la PE par transméthylation.

Les mollusques bivalves peuvent utiliser la biosynthèse *de novo*, mais ils ne seraient pas capables de décarboxyler la PS en PE (Shieh, 1968). Chez eux, la synthèse des glycérolipides se fait plutôt par le biais de transacylation à partir des lipides alimentaires que par biosynthèse *de novo* (Parker and Selivonchick, 1986).

## Revue bibliographique

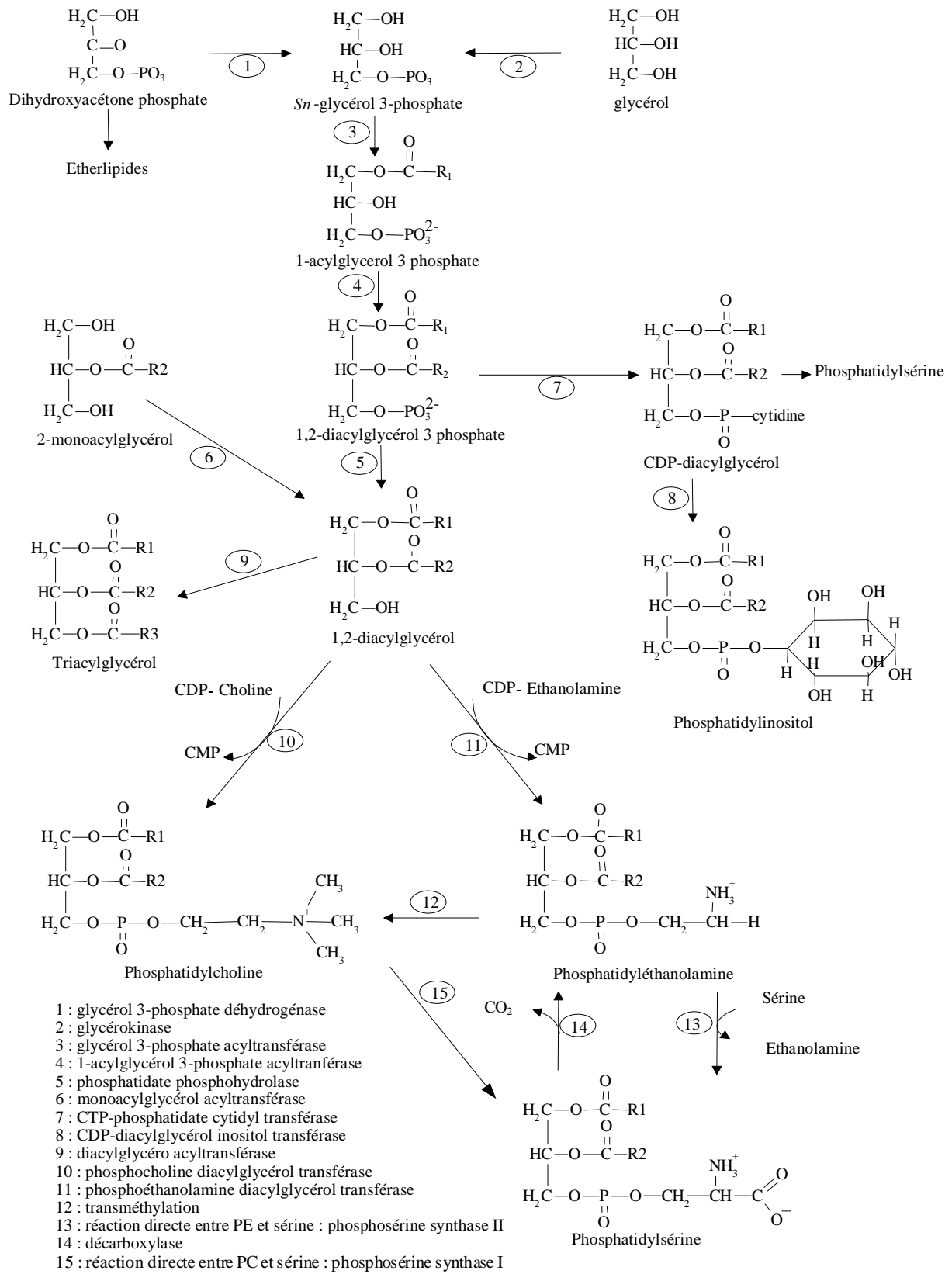


Figure 18: Biosynthèse des phospholipides

### 3.6.2.2 BIOSYNTHESE DES ETHERGLYCEROPHOSPHOLIPIDES (FORMES ALKYLACYL ET PLASMALOGENES)

---

La biosynthèse des lipides éthers est différente de celles des diacylphosphoglycérides et implique une coordination complexe des péroxysomes, du cytosol et du réticulum endoplasmique.

La première phase de la synthèse des plasmalogènes est la synthèse des alkylacylphospholipides (Lee, 1998; Nagan and Zoeller, 2001; Brites et al., 2004) (Figure 19). Le DHAP (dihydroxyacétone phosphate) est d'abord estérifié avec un acyl-CoA par une DHAP-AT (DHAP acyl transférase). Le 1-acyl-DHAP résultant est ensuite transformé en 1-alkyl-DHAP par le remplacement, par une ADHAP-S (alkyl-DHAP synthase) de l'acide gras en position *sn*-1 par un alcool gras. Ces deux réactions ont lieu dans le peroxyosome, où la DHAP-AT et la ADHAP-S sont exclusivement localisées, et sont spécifiques à la synthèse des etherphospholipides. Au contraire, les réactions suivantes sont également impliquées dans la synthèse des diacylphospholipides. La réduction, par une AADHAP-R, du cétone en position *sn*-2 du 1-alkyl-DHAP, mène à la formation de 1-alkyl-G3P. La AADHAP-R étant localisée dans les peroxyosomes et dans le réticulum endoplasmique (RE), cette réaction a lieu aux deux endroits. La formation de 1-alkyl-2-acyl-G3P a lieu dans le RE par l'incorporation d'un acyl-CoA en position *sn*-2 par une AAG3P-AT (alkylacyl-G3P acyl transférase). Une PH (phosphate hydrolase) enlève le groupement phosphate de cet 1-alkyl-2-acyl-G3P pour former un 1-alkyl-2-acyl-glycérol. Enfin, une CDP-ethanolamine est incorporée au 1-alkyl-2-acyl-glycérol par l'action d'une E-PT (éthanolamine phospho transférase), menant à la formation d'une 1-alkyl-2acyl-GPE. La liaison éther en position *sn*-1 est ensuite désaturée par une  $\Delta$ 1-desaturase, spécifique de l'éthanolamine, menant à la formation de la 1-alkenyl-2-acyl-GPE (PEplsm).

Bien que la voie de biosynthèse de la PEplsm ait été clairement caractérisée, le mécanisme de biosynthèse de la PCplsm n'est toujours pas connu, un certain nombre de résultats laissant à penser que la PEplsm est le précurseur de la PCplsm (Lee et al., 1991). Chez les mollusques marins, l'origine de la présence de PSplsm est aujourd'hui inconnue.

Une étude *in vivo* réalisée sur différents tissus de rat indique que la PSplsm ne serait pas synthétisée par une réaction d'échange directe entre la PEplsm et la sérine. De plus, la reformation de la PE par décarboxylation la PS semblerait être uniquement possible lors de la biosynthèse des formes diacyles (Arthur and Page, 1991).

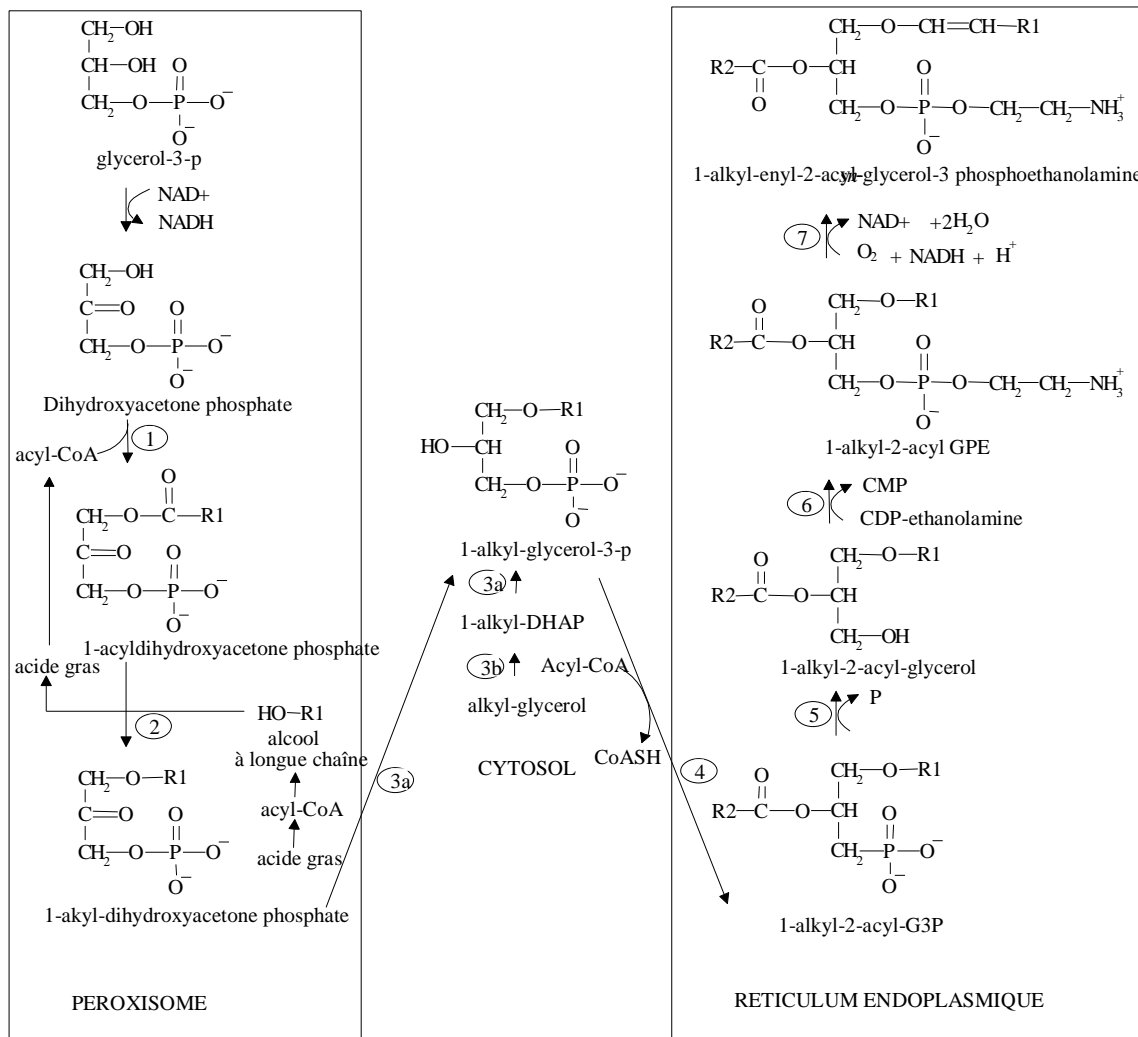


Figure 19: Biosynthèse de la PE plasmalogène

### **3.7 FONCTIONS CELLULAIRES ASSOCIEES AUX LIPIDES MEMBRANAIRES : IMMUNITE ET/OU PLASMALOGENES**

#### **3.7.1 COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET FONCTIONS IMMUNITAIRES**

A travers des expériences de nutrition, Delaporte et al. (2003; 2006; 2007) ont étudié les relations entre la composition en acides gras des membranes cellulaires et les paramètres hématocytaires des huîtres. Ces résultats avaient alors souligné l'importance des lipides membranaires dans la modulation des paramètres fonctionnels des hémocytes. Delaporte et al. (2003; 2006; 2007) ont relié les plus fortes concentrations hématocytaires à des taux élevés en 20:4n-6 et en 20:5n-3 dans les membranes. De plus, ils avaient également remarqué que l'incorporation de 20:4n-6 dans les membranes des huîtres avait un effet positif sur l'activité de phagocytose des hémocytes des huîtres, comme démontré auparavant chez les vertébrés supérieurs (Lennartz, 1999). A l'inverse, de fortes proportions de 20:5n-3 dans les membranes cellulaires semblaient avoir un effet inhibiteur sur l'activité de phagocytose. Similairement, un rôle immunodépresseur des acides gras de la série n-3 avait été mis en évidence sur les lymphocytes des vertébrés supérieurs (de Pablo and de Cienfuegos, 2000; Calder, 2001; de Pablo et al., 2002). Delaporte et al (2003; 2005) ont suggéré un effet compétiteur du 20:5n-3 sur le 20:4n-6 comme cela avait déjà été observé chez les vertébrés. Comme Horrobin et al. (2002) et Harbige (2003), l'avaient souligné, un ratio n-3/n-6, et peut être plus spécifiquement 20:5n-3/20:4n-6, pourrait exister et réguler cette fonction hémocytaire. De la même manière, dans ces expériences, la production de ERO avait été différemment affectée par ces deux AGPI : stimulée avec une forte incorporation de 20:4n-6, mais inhibée avec celle du 20:5n-3. Cela suggère une augmentation de la disponibilité du 20:4n-6 pour la production d'eicosanoïdes et l'activation de la NADPH-oxydase, de façon similaire à ce qui avait été observé chez les vertébrés supérieurs (Lennartz, 1999; Calder, 2001). Les effets opposés du 20:4n-6 et du 20:5n-3,

concernant à la fois l'activité de phagocytose et la production d'ERO, reflètent certainement des fonctions différentes de ces acides gras dans les membranes.

---

### **3.7.2 POLYMORPHISME LIPIDIQUE**

Après avoir été isolés de la membrane cellulaire, certains phospholipides placés en solution aqueuse ont tendance à adopter spontanément d'autres assemblages que celui en bicouche, tels que les structures en phase hexagonale inverse, dite  $H_{II}$ , qui est la structure non-lamellaire la plus fréquemment rencontrée (de Kruijff, 1997b) (Figure 20). Bien que cela n'ai jamais été démontré dans les membranes biologiques, les membranes synthétiques adopteraient l'une ou l'autre des ces conformations en fonction de leur composition en classes de phospholipides, certaines classes ayant la propriété de promouvoir des transitions de phase (de la phase lamellaire vers la phase hexagonale inverse, notamment). Il est reconnu que la quantité de ces phospholipides particuliers dans les membranes cellulaires serait proportionnelle à leur fonctionnalité (de Kruijff, 1997a). Plus précisément, ils seraient à l'origine de pressions latérales des chaînes grasses qui stabiliseraient les protéines membranaires intrinsèques dans une orientation et une structure spatiale fonctionnelle (Giorgione et al., 1995; de Kruijff, 1997b). Bien que le rôle des plasmalogènes dans le polymorphisme membranaire ne soit pas totalement élucidé, il a été suggéré que leur liaison vinyl-éther, beaucoup moins hydrophile qu'une liaison ester, augmenterait la préférence de ces composés à adopter des structures non lamellaires  $H_{II}$  (Lohner et al., 1984; Nagan and Zoeller, 2001). Cette tendance serait toutefois plus importante pour la PEplsm que pour la PCplsm, compte tenu de la taille de la tête polaire de la PE (Lohner et al., 1984). Le rôle dans la structure cellulaire de cet arrangement pourrait être important dans des formations locales et temporaires, lors de fusions de membranes ou au cours des interactions de la membrane avec des facteurs externes tels que les ions ou les protéines et permettrait d'augmenter la perméabilité des membranes aux ions (Glaser and Gross, 1994; Nagan and Zoeller, 2001).

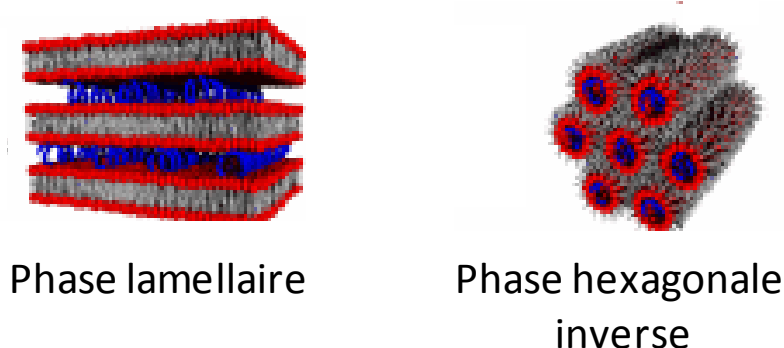


Figure 20: Représentation schématique des phases lamellaire et hexagonale inverse

### 3.7.3 COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PLASMALOGENES ET ASSOCIATION SPECIFIQUE AVEC CERTAINS AG PARTICULIERS CHEZ LES BIVALVES

Les chaînes aliphatiques avec une liaison éther (en position *sn*-1) sont, dans la plupart des cellules, des chaînes à 16:0, 18:0 ou 18:1 carbones. Le 20:1 est également présent chez les invertébrés marins, mais dans de plus faibles proportions (Jeong et al., 1990; Koizumi et al., 1990; Soudant et al., 1995). Chez les mammifères, les chaînes acyles (en *sn*-2) des formes plasmalogènes sont principalement des chaînes polyinsaturées à 20 et 22 carbones. Parmi celles-ci, le 20:4n-6 est souvent l'AGPI majoritairement associé à cette sous-classe de phospholipide (Paltauf, 1983b; Engelmann et al., 1992; Knapp et al., 1994; Nagan and Zoeller, 2001). En revanche, chez les mollusques, ces informations sont rares. Seuls Jeong et al. (1990) et Koizumi et al. (1990) ont montré chez l'huître *C. gigas* que ces chaînes sont également constituées d'AGPI à 20 et 22 carbones, cependant ce n'est plus le 20:4n-6 mais les NMI qui sont majoritairement associés à cette forme de phospholipide chez cette espèce.

Récemment, les compositions en AG de chacune des formes plasmalogènes (PEplsm, PCplsm et PSplsm) ont été décrites et comparées à celles observées dans les fractions diacyles correspondantes (Kraffe et al., 2004). Cette étude a été réalisée sur trois espèces de



bivalves (*C. gigas*, *R. philippinarum* et *M. edulis*), ainsi que dans différents organes de *R. philippinarum*. Dans chacune de ces trois espèces de bivalves, Kraffe et al. (2004) ont observé une association spécifique entre les plasmalogènes, et plus particulièrement les formes aminoplasmalogènes (PEplsm et PSplsm), avec les AG NMI ainsi que, dans une moindre mesure, au 20:1n-11. Le plus fort niveau de cette association a été observé dans les branchies, où la proportion de plasmalogènes était également la plus forte. Une étude réalisée par la suite par ces mêmes chercheurs (Kraffe et al., 2006), mais sur des Pectinidés (*P. maximus* et *A. purpuratus*) a montré une association spécifique similaire des aminoplasmalogènes, mais avec un autre AG, le 22:4n-9trans $\Delta$ 13. Chez les bivalves, les proportions de 20 et 22 NMI peuvent être importantes dans les familles de Mytilidés et d'Ostréidés, mais restent à l'état de traces dans la famille des Pectinidés (Joseph, 1982; Zhukova and Svetashev, 1986; Marty et al., 1992; Napolitano et al., 1992; Marty et al., 1999). Le 22:4n-9trans $\Delta$ 13 est lui important chez certains Pectinidés (Soudant et al., 1995; Soudant et al., 1996; 1997; Marty et al., 1999), mais inexistant chez d'autres familles. Cet AG étant absent des microalgues, il est probablement biosynthétisé *de novo* par ces bivalves et il pourrait jouer, chez certains Pectinidés, un rôle identique à celui des NMI chez les autres bivalves (Marty et al., 1999). Les études de Kraffe et al. (2004; 2006) semblent confirmer cette hypothèse. D'autre part, d'autres espèces, telle la mye *Mya arenaria*, présentent comme les Pectinidés des teneurs réduites en NMI, mais sans toutefois contenir du 22:4n-9trans $\Delta$ 13 (Kraffe, 2003). Chez la mye, une association spécifique entre le 20:1n-11 et les aminoplasmalogènes a été observée. L'ensemble de ces travaux ont mis en évidence une association spécifique des plasmalogènes avec des acides gras particuliers, très probablement biosynthétisés *de novo*, et dont la nature varie en fonction de l'espèce considérée : NMI, 20:1n-11 ou 22:4n-9trans $\Delta$ 13 (Kraffe, 2003; Kraffe et al., 2004; 2006). Les résultats originaux de ces études laissent supposer des rôles structuraux et/ou fonctionnels importants de ces associations spécifiques entre les plasmalogènes et ces AG biosynthétisés.

#### 3.7.4 RÔLE DE L'ASSOCIATION SPECIFIQUE DES PLASMALOGENES A CERTAINS AG PARTICULIERS

Plusieurs rôles physiologiques ont été attribués aux plasmalogènes, mais malgré de nombreux progrès réalisés ces quinze dernières années, ces fonctions n'ont pas encore été pleinement validées (Nagan and Zoeller, 2001). Les plasmalogènes pourraient servir de stockage terminal de l'acide arachidonique (20:4n-6) précurseur de prostaglandines et de thromboxanes (Hawthorne and Ansell, 1982; Engelmann et al., 1992), ou bien de substrat pour la biosynthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) (Nieto et al., 1991). Du fait de l'absence de la liaison ester en position *sn*-1, les plasmalogènes sont résistants à l'action des phospholipases A<sub>1</sub> membranaires sur lesquelles ils exerceraient même une action inhibitrice (Paltauf, 1983b). Il a également été proposé que la liaison vinyl-éther puisse agir comme antioxydant dans les membranes. Dans ce sens, cette liaison proche de la surface jouerait un rôle de piège de radicaux libres de l'oxygène. Ainsi, les plasmalogènes retarderaient nettement l'oxydation des doubles liaisons des AGPI (Nagan and Zoeller, 2001; Leray et al., 2002). Le turn-over très rapide des molécules de plasmalogènes (1/2 vies de 15,1 minutes et 23,1 minutes, pour PCplsm et PEplsm, respectivement), observées au niveau des synapses, dans le cerveau de rat, supporterait cette hypothèse (Rosenberger et al., 2002). Ces plasmalogènes seraient très rapidement remplacés une fois dégradés.

De plus, cette liaison vinyl-éther pourrait avoir un rôle déterminant dans les propriétés physico-chimiques des biomembranes et participer au transport trans-membranaire des ions dans les tissus à activité électrique élevée (Paltauf, 1983b). Le mécanisme proposé suppose que les plasmalogènes, possédant un groupe carbonyle en moins, seraient moins hydratés à l'interface hydrophile-hydrophobe de la membrane, ce qui la rendrait plus perméable aux ions. Suivant leur abondance dans les membranes biologiques, les plasmalogènes pourraient permettre de maintenir des différences de polarités importantes (Paltauf, 1983b). Il n'existe pas de résultats montrant l'association spécifique et fonctionnelle de certaines enzymes membranaires avec les plasmalogènes. Néanmoins, des observations concernant certaines protéines laissent à penser que la spécificité des groupes carbonyles (inversement pour les

plasmalogènes) modifierait les interactions protéines-phospholipides et donc leurs fonctions (Paltauf, 1983b; Duhm et al., 1993). Ces différences pourraient également être dues à des modifications des propriétés physiques de la membrane. Chez les mollusques, on attribue un rôle important aux plasmalogènes dans les propriétés de perméabilité des membranes biologiques. Ils seraient métabolisés en réponse à des stress environnementaux afin de maintenir l'intégrité de l'architecture cellulaire. Par exemple, l'augmentation de perméabilité provoquée par une augmentation de température serait compensée par une augmentation des proportions de plasmalogènes (Chapelle, 1987). Une forte capacité de résistance des plasmalogènes face aux virus, aux toxines ou à l'hydrolyse enzymatique a également été suggérée (Chelomin and Zhukova, 1981; Paltauf, 1983b).

Le rôle des acides gras particuliers spécifiquement associés aux plasmalogènes chez les bivalves marins (NMI, 20:1n-11 ou 22:4n-9*trans*Δ13), n'est pas établi à ce jour. Toutefois, les NMI ont été associés à plusieurs fonctions dans les membranes cellulaires (Ackman and Hooper, 1973; Klingensmith, 1982). Ces acides gras, de par leur longueur de chaîne, leur degré d'insaturation et la position des doubles liaisons pourraient avoir un rôle dans la résistance aux attaques microbiennes et à l'oxydation, ou avoir d'importantes fonctions liées à l'activité des enzymes membranaires (Irazu et al., 1984; Zakhartsev et al., 1998; Barnathan, 2009). Il a également été supposé qu'ils pourraient se substituer à l'acide arachidonique en tant que précurseurs de prostaglandines et de thromboxanes chez les mollusques (Paradis and Ackman, 1977). A l'inverse, l'hypothèse émise par Rabinovich and Ripatti (1991) indiquait que ces NMI seraient probablement le résultat de l'activité de désaturases peu spécifiques et peu spécialisées chez ces animaux primitifs. Il avait alors été supposé que leur rôle serait limité au maintien de la fluidité membranaire chez ces animaux poïkilothermes.

### 3.7.5 PLASMALOGÈNES ET PATHOLOGIES

Une déficience en plasmalogènes a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies humaines telles que les syndromes de Zellweger et de Down, la chondrodysplasie rhizomélique, les maladies d'Alzheimer et de Niemann-Pick, la rétinite pigmentaire et même le vieillissement (Brites et al., 2004; Leßig and Fuchs, 2009). Cette diminution peut être le résultat d'une synthèse en plasmalogènes défectueuse, due à la disparition des peroxyosomes ou à des activités enzymatiques réduites liées, par exemple, à des erreurs de localisation sub-cellulaire des enzymes péroxysomales impliquées dans la synthèse de ces molécules. Dans de nombreux cas, de par leur potentiel rôle antioxydant, une déficience en plasmalogènes peut également résulter d'une augmentation de leur taux de dégradation, par l'action d'espèces réactives, comme les ERO, qui peuvent être produits en grande quantité lors d'événements inflammatoires.

Des cancers ont également été mis en relation avec des variations de la teneur des cellules en plasmalogènes, ainsi qu'en alkylacylphospholipides. Il s'agit majoritairement d'une augmentation de ces teneurs dans les tumeurs (Snyder and Wood, 1968; 1969; Howard et al., 1972; Ruggieri et al., 1999; Fallani et al., 2006). Cependant, certains cancers, comme le cancer du sein, ont pu être associés à une diminution des proportions d'alkylacylphosphatidylcholine et de PEplsm (Katz-Brull et al., 2002). Ces auteurs n'ont pu donner aucune explication à cette observation, puisque les rôles joués par les phospholipides éthers dans les cellules de mammifères sont encore peu clairs. Très récemment, Shan and Davis (2006) ont déposé un brevet concernant une méthode pour détecter le cancer de l'ovaire, en analysant la variation de la proportion de PEplsm entre des cellules saines et des cellules à diagnostiquer. L'hypothèse émise dans le cas du cancer ovarien serait que les plasmalogènes sont dégradés par les ERO produits lors du phénomène inflammatoire, menant à la dégradation des plasmalogènes et ainsi à la diminution de leur proportion dans les membranes des cellules cancéreuses.





# MATERIEL ET METHODES

## MATERIEL ET METHODES

La néoplasie disséminée ainsi que les compositions lipidiques et les paramètres fonctionnels des hémocytes ont été analysés chez des espèces de bivalves pouvant être atteintes de néoplasie disséminée comme la coque (*Cerastoderma edule*) et la mye (*Mya arenaria*), ou non, comme l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*). Les analyses réalisées sur chaque modèle animal sont détaillées dans la Figure 21. Les coques du bassin d'Arcachon ont fait l'objet d'un suivi annuel (2007-2008) durant lequel la néoplasie disséminée a été étudiée (Figure 21A). Lors d'un point de ce suivi (octobre 2007), les compositions lipidiques des hémocytes ont été analysées. Un point supplémentaire pour l'étude de la néoplasie disséminée a été réalisé en mars 2009, au cours duquel les paramètres fonctionnels des hémocytes de coques ont pu être déterminés (Figure 21B). La néoplasie disséminée, les compositions lipidiques des hémocytes et les paramètres hémocytaires des myes ont été étudiés sur des individus collectés sur l'île du Prince Edouard (Canada) en mai 2008 (Figure 21C). Enfin, les compositions lipidiques des hémocytes de palourdes et d'huîtres, respectivement collectées sur les sites de Landéda et de Plougastel dans le Finistère, ont été analysées sur des animaux collectés respectivement en décembre 2006 et janvier 2007 (Figure 21D). Chacune des méthodes utilisées lors de ces analyses est décrite ci-après.



## Matériel et méthodes

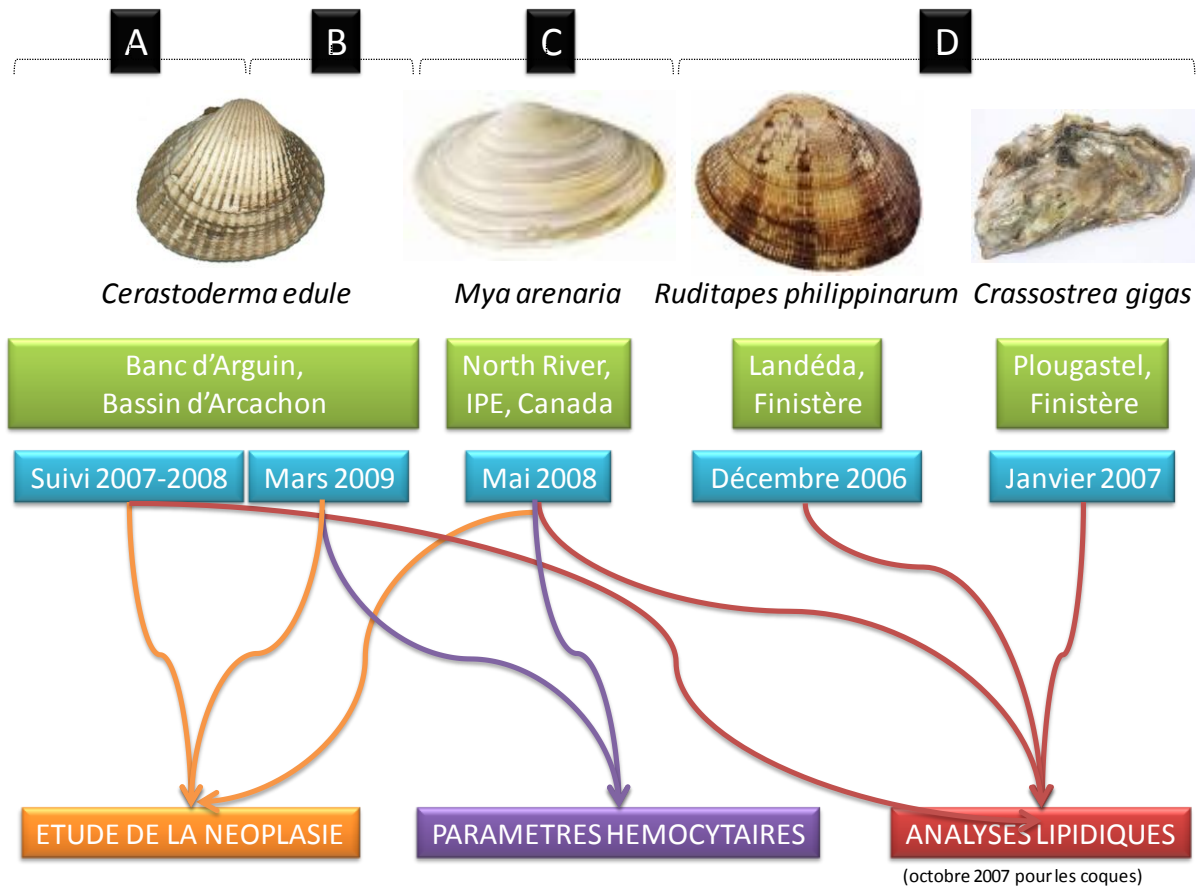


Figure 21: Vue d'ensemble des principales analyses et études réalisées lors de la présente thèse : modèles biologiques, lieu et date d'échantillonnage, et analyses réalisées.

## 1 CARACTERISATION ET ETUDE DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE CHEZ LA COQUE DU BASSIN D'ARCACHON

### 1.1 SITE D'ETUDE

L'étude de la néoplasie disséminée a été réalisée sur des coques *Cerastoderma edule* provenant du Banc d'Arguin. Ce banc de sable est situé à l'entrée du bassin d'Arcachon, dans le Sud-Ouest de la France (44° 40'N, 1°10'W) (Figure 22). Le bassin d'Arcachon, de régime macrotidal, constitue un milieu de mélange permanent entre les apports fluviaux et l'océan Atlantique. Ce banc est donc baigné par des eaux océaniques, présentant une température et une salinité variant saisonnièrement, de 9.5 à 21°C et de 34 à 35 psu, respectivement. La zone intertidale du Banc d'Arguin est constituée de 500 ha environ, dont 45 ha émergés en permanence, de sables moyens (médiane = 360 µm). Dans les aires intertidales, où vivent les coques, à une densité d'environ 50 individus.m<sup>-2</sup>, la température du sédiment peut varier de -1 à 32°C.

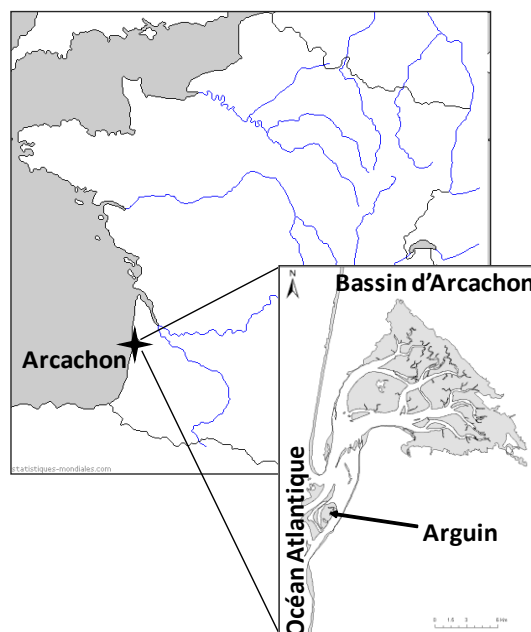


Figure 22: Site d'étude de la néoplasie disséminée : le Banc d'Arguin est situé à l'entrée du bassin d'Arcachon.

## **1.2 SUIVI SAISONNIER ET ETUDE SURFACE-PROFONDEUR**

Deux cent coques (seulement 100 en avril) ont été collectées, à huit reprises tous les 45 jours, de février à décembre 2007, pour un suivi saisonnier de la néoplasie disséminée. Toutes ces coques mesuraient autour de 30 mm (taille commerciale) et ont été prélevées à la même profondeur dans le sédiment. Cette profondeur était de 0.5 à 3 cm sous la surface du sédiment, profondeur à laquelle les coques sont naturellement enfouies.

Afin de tester l'effet de la position des coques dans le sédiment (enfouies vs. non enfouies) sur les caractéristiques de la néoplasie disséminée, une étude « surface-profondeur » a été menée. Pour cela, deux échantillonnages supplémentaires, de 200 et 500 coques, ont été réalisés en février 2008 et en mars 2009, respectivement. Les coques ont été prélevées soit à leur profondeur d'enfouissement naturelle dans le sédiment (coques enfouies), soit à la surface du sédiment (coques non enfouies), position souvent considérée comme les prémices de la mort (Desclaux et al., 2002).

Au total, 2200 coques ont donc été collectées. Les 100 coques enfouies échantillonnées en février 2008 ont été utilisées à la fois pour le suivi saisonnier et l'étude "surface-profondeur". Une fois collectées, les coques ont été utilisées immédiatement ou bien placées dans des bacs alimentés en eau de mer circulante, pendant deux jours au maximum avant prélèvement. La température de l'eau de mer au niveau du site d'échantillonnage a été relevée à chaque point de prélèvement.

### 1.3 PRELEVEMENT D'HEMOLYMPHE

L'hémolymph de chacune des 2200 coques échantillonnées a été prélevée au niveau de leur muscle adducteur postérieur, à l'aide d'une aiguille stérile hypodermique (calibre 25) montée sur une seringue en plastique de 1 mL (Figure 23). Les seringues ont été maintenues dans la glace avant utilisation ultérieure, pour éviter l'agrégation des hémocytes. Pour chaque prélèvement d'hémolymph individuel, une fraction d'hémolymph a été examinée en microscopie optique. Ceci a permis d'effectuer un premier diagnostic « grossier » de la néoplasie disséminée. Deux groupes de coques ont alors été formés : des coques « saines » et des coques « malades ». Les échantillons d'hémolymph étaient considérés comme provenant de coques « saines » lorsqu'aucune cellule anormale n'était observée en microscopie optique, et comme provenant de coques « malades » si une ou plusieurs cellules anormales pouvaient être observées. Morphologiquement, les cellules anormales sont plus grosses que les hémocytes et sont en général détectables assez facilement grâce à leur aspect plus « contrasté » (Figure 24). De plus, l'hémolymph contenant des cellules anormales en forte proportion a une apparence trouble, leur concentration augmentant avec le développement de la maladie, allant jusqu'à un aspect blanchâtre et laiteux dans les cas les plus avancés. Ces observations microscopiques ont aussi permis de déceler toute contamination de l'hémolymph par des gamètes, des bactéries ou des débris de tissus. Tous les échantillons présentant une contamination et/ou dont la qualité a été jugée insatisfaisante ont été écartés des analyses ultérieures. Les échantillons d'hémolymph ainsi sélectionnés ont ensuite été transférés individuellement dans des microtubes, en étant toujours maintenus dans la glace. Après cette sélection, le nombre d'échantillons a été réduit de 2200 à 1838. Le suivi saisonnier a été conduit sur 1236 échantillons d'hémolymph effectifs et l'étude « surface-profondeur » sur 676.

## Matériel et méthodes

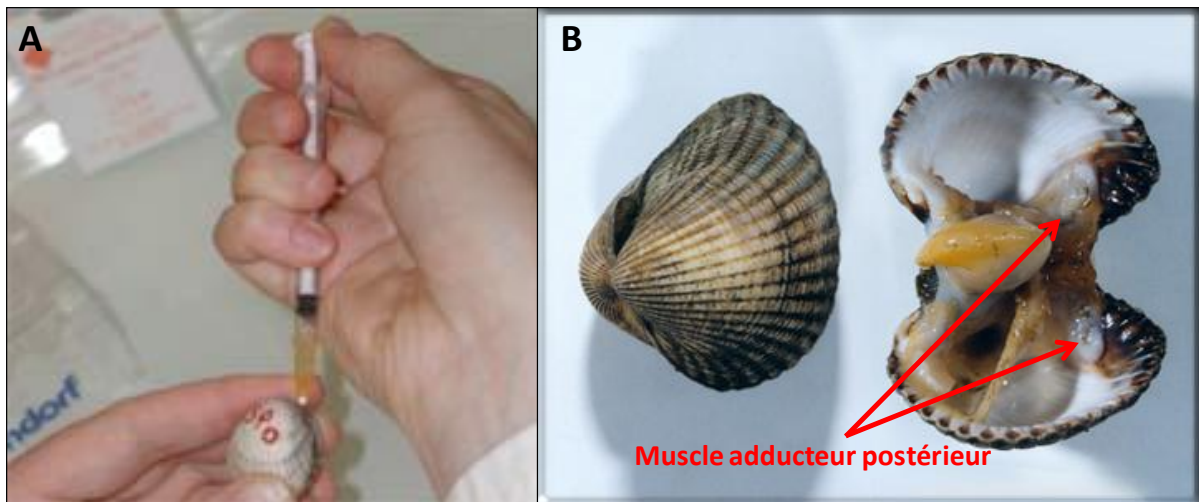


Figure 23: A : prélèvement d'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur d'une coque *Cerastoderma edule*. B : localisation de ce muscle.

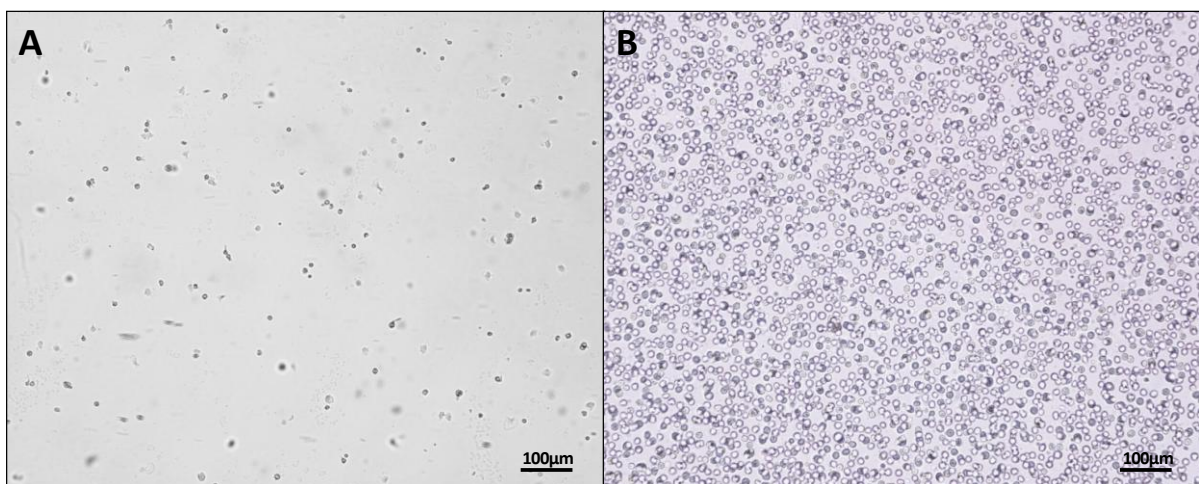


Figure 24: Echantillons bruts d'hémolymphe. A : hémolymphe d'une coque « saine ». B : hémolymphe d'une coque « malade ». Sans coloration. Grossissement x 20.

---

## **1.4 HISTOLOGIE**

Deux techniques complémentaires de microscopie optique ont été utilisées afin de caractériser morphologiquement la néoplasie disséminée chez les coques du bassin d’Arcachon : l’observation de frottis de cellules d’hémolymphe et l’observation de coupes histologiques.

---

### **1.4.1 FROTTIS D’HÉMOLYMPHE**

#### **1.4.1.1 CYTOCENTRIFUGATION**

---

Lors des échantillonnages réalisés entre juillet 2007 et février 2008, 9 à 14 échantillons d’hémolymphe ont été sélectionnés à chaque point de prélèvement, pour un total de 56 échantillons. Ces échantillons ont été sélectionnés aléatoirement parmi les groupes de coques « saines » et « malades ». Le seul critère utilisé a été de sélectionner, pour chaque date d’échantillonnage, environ 50% d’échantillons provenant de coques « saines » et 50% d’échantillons provenant de coques « malades ». Une fraction de ces 56 échantillons a été utilisée pour réaliser des frottis d’hémolymphe. Bien qu’un tel diagnostic, mené sur des échantillons bruts d’hémolymphe, soit rapide et grossier, des analyses ultérieures, réalisées par histologie et par cytométrie en flux, ont révélé qu’il permettait d’avoir une estimation fiable de la présence de néoplasie disséminée et de son développement.

Les frottis d’hémolymphe ont été réalisés par projection des cellules sur des lames de verre par cytocentrifugation, en suivant la méthode décrite par Carballal et al. (1997). Pour chacun des 56 échantillons sélectionnés, 50  $\mu\text{L}$  d’hémolymphe ont été mélangés à 100  $\mu\text{L}$  d’une solution antiagrégante d’Alsever modifiée (glucose : 20.8  $\text{g.L}^{-1}$ ; citrate de sodium : 8

## Matériel et méthodes

$\text{g.L}^{-1}$ ; EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) :  $3.36 \text{ g.L}^{-1}$ ; NaCl:  $22.3 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Bachère et al., 1988). Les échantillons ainsi dilués ont ensuite été déposés dans un dispositif adapté à la cytocentrifugeuse. Le tout est centrifugé à  $92g$  pendant 5 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les frottis d'hémolymphes obtenus ont ensuite été fixés et colorés grâce au kit de coloration Hemacolor (Merck, Darmstadt, Germany). 1 mL de chacune des trois solutions contenues dans ce kit ont été appliquées les unes à la suite des autres pendant 1 min. Les solutions contiennent de l'hématoxyline qui colore les noyaux (acides) en bleu-violet et de l'éosine qui colore le cytoplasme (basique) en rose (Figure 25). Enfin, les lames ont été montées en Eukitt.

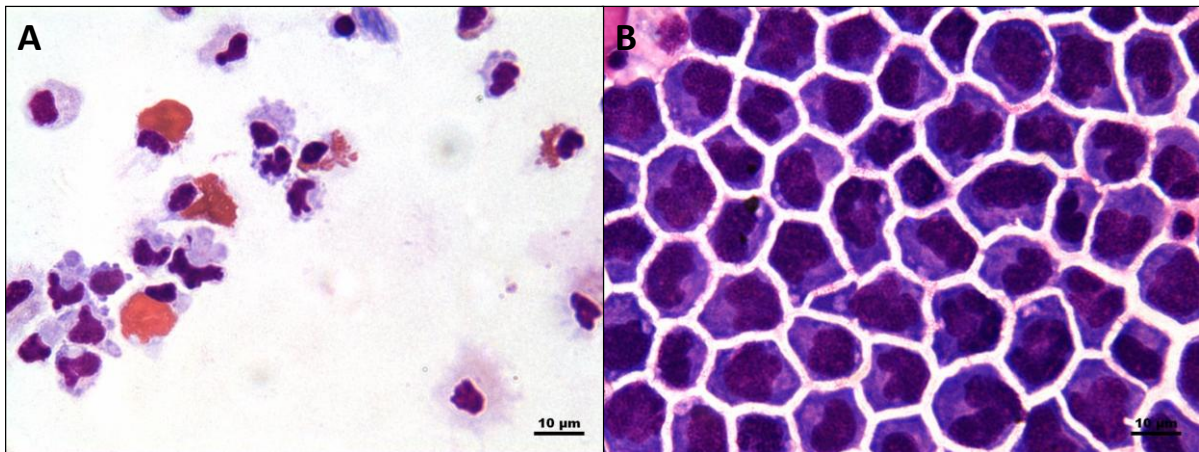


Figure 25: Frottis d'hémolymphes réalisés par la méthode de cytocentrifugation. A : hémolymphes d'une coque « saine ». B : hémolymphes d'une coque « malade ». Coloration éosine/hématoxyline. Grossissement x 100.



#### 1.4.1.2 TECHNIQUE DES LAMES POLY L-LYSINE

---

Une autre technique a été testée pour réaliser des frottis d'hémolymphe. Il s'agit de la méthode d'adhésion cellulaire utilisée par da Silva and Villalba (2004), sur des lames de Poly L-Lysine. La Poly L-Lysine est préparée par dilution d'une solution mère (SIGMA P-8920) à 1/10 avec de l'eau distillée. Cette solution peut être conservée pendant 3 mois entre 2°C et 6°C. Avant utilisation, la solution doit être remise à température ambiante puis filtrée. Après avoir été lavées à l'éthanol acide (HCl 1% en éthanol 70°), les lames ont été trempées dans la solution de Poly L-Lysine pendant 5 minutes puis mises à sécher à température ambiante pendant une nuit, ou à 60°C pendant 1h.

50 µl d'hémolymphe ont été déposés au milieu d'une lame Poly L-Lysine qui a ensuite été conservée pendant 30 minutes dans une chambre humide, afin de laisser les cellules adhérer. Le frottis a ensuite été fixé avec du glutaraldéhyde dilué à 1,25% dans du tampon sodium phosphate (0,1M, pH=7,4) et coloré grâce au kit de coloration Hemacolor (Merck, Darmstadt, Germany). Enfin, les lames ont été montées en Eukitt. Cette méthode a été finalement délaissée au profit de la technique de cytocentrifugation, plus rapide, plus facile d'exécution et surtout menant à un résultat de meilleure qualité (Figure 25 vs. Figure 26).

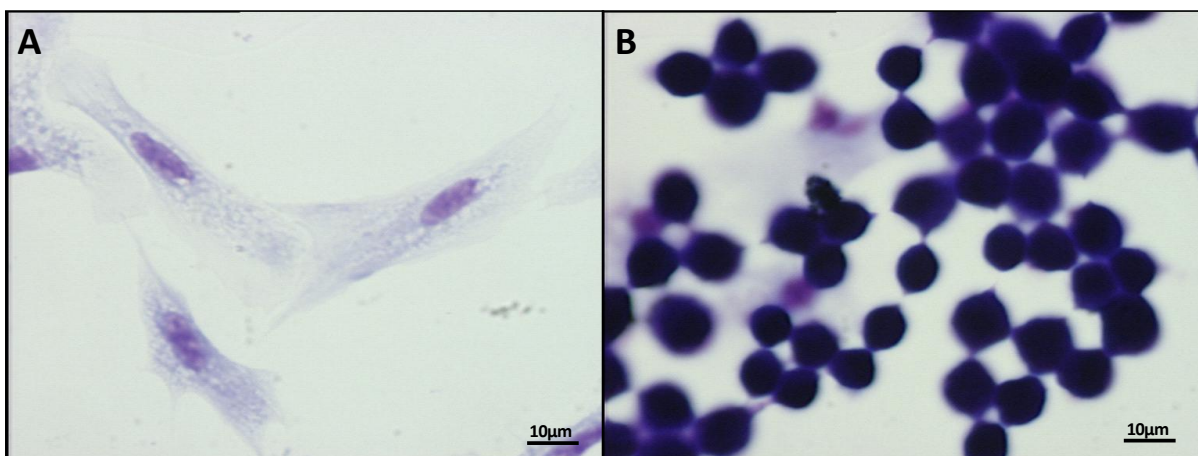


Figure 26: Frottis d'hémolymphe réalisés par la méthode des lames Poly L-lysine. A : hémolymphe d'une coque « saine ». B : hémolymphe d'une coque « malade ». Coloration éosine/hématoxyline. Grossissement x 100.



#### **1.4.2 COUPES HISTOLOGIQUES DE TISSUS**

En octobre 2007, les 14 coques correspondant aux 14 échantillons d'hémolymphe sélectionnés pour la réalisation des frottis ont été utilisées pour la réalisation des coupes histologiques. Pour chaque coque, des sections de tissus d'environ 5 mm d'épaisseur ont été excisées à partir des branchies, de la gonade+glande digestive, des muscles adducteurs, du pied et du manteau. Ces sections ont ensuite été fixées dans une solution de Bouin (Howard and Smith, 1983) pendant 24h, à 4°C, pour ensuite être déshydratées dans des bains successifs d'alcool éthylique en concentration croissante : 30 minutes dans de l'alcool à 30% suivis de 30 minutes dans de l'alcool à 50%, puis des bains successifs dans de l'alcool à 70% pendant 24h, et enfin deux bains de 30 minutes dans de l'alcool à 95%. La dernière étape de déshydratation consiste à placer les échantillons dans trois bains successifs d'alcool butylique durant deux jours. Les fragments de tissus ont été ensuite inclus dans de la paraffine (deux bains de deux heures à 56°C, puis inclusions) et stockés au frais. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été effectuées dans ces blocs, fixées et colorées par la solution d'hématoxyline et d'éosine de Harris (Howard and Smith, 1983).

#### **1.4.3 CRITERES DE DIAGNOSTIC ET DETERMINATION DU STADE DE DEVELOPPEMENT (OU INTENSITE) DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE**

Les frottis d'hémolymphe et les coupes histologiques de tissus ont été examinés en microscopie optique, dans le but de mettre en évidence la présence de cellules anormales liées à la néoplasie disséminée. Ces cellules anormales étaient notamment distinguables par leur taille, à la fois de cellule mais aussi de noyau, supérieure à celle des hémocytes. L'intensité de la néoplasie disséminée a été déterminée selon les critères de Brousseau et Baglivo (1991) en ce qui concerne les frottis alors qu'un protocole modifié à partir de Mix (1983) a été utilisé pour les coupes histologiques. En fonction de la proportion de cellules

anormales, dans l'hémolymphe ou dans les organes, trois stades de développement de la maladie ont été différenciés. Les coques ont été classées comme « saines » si aucune cellule anormale n'était observée, ni dans l'hémolymphe, ni dans les organes ; comme « légèrement à modérément malades » quand moins de la moitié des cellules de l'hémolymphe étaient anormales et quand des cellules anormales isolées étaient visibles dans les branchies et la gonade+glande digestive ; et comme « très malades » quand plus de la moitié des cellules de l'hémolymphe étaient anormales, que des amas de cellules anormales étaient observées dans les branchies et la gonade+glande digestive et que des cellules isolées étaient observées dans les muscles adducteurs, le manteau et le pied (Table 4).

Table 4: Récapitulatif des différentes méthodes de diagnostic par microscopie optique, des critères utilisés et des diagnostics correspondants.

Diagnostic	Observation en microscopie optique		
	Hémolymphe brute	Frottis d'hémolymphe	Coupes histologiques d'organes
Saine	Absence de cellules anormales	Pas de cellules anormales	Pas de cellules anormales
Légèrement à modérément malade	Présence de cellules anormales	< 50% de cellules anormales	Cellules anormales isolées dans les branchies et la gonade+glande digestive
Très malade		> 50% de cellules anormales	Amas de cellules anormales dans les branchies et la gonade+glande digestive; Cellules anormales isolées dans le pied, le manteau et les muscles adducteurs

## 1.5 ESTIMATION DU CONTENU EN ADN PAR CYTOMETRIE EN FLUX

### 1.5.1 GENERALITES SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX

Individuellement, chaque cellule intercepte un faisceau laser incident, menant à l'émission de deux signaux de diffraction, l'un aux petits angles (FSC : Forward Scatter light), dont l'intensité est proportionnelle à la taille relative de la cellule, et l'autre aux grands angles (SSC : Side Scatter light), dont l'intensité est proportionnelle à la structure interne ou « complexité » relative des cellules (granularité, organelles, rapport nucléo-cytoplasmique, etc.) (Figure 27). Par ailleurs, sous l'effet de l'excitation du laser, les cellules peuvent émettre un signal de fluorescence si elles sont naturellement autofluorescentes ou si elles ont été marquées par un ou plusieurs fluorochromes artificiels.

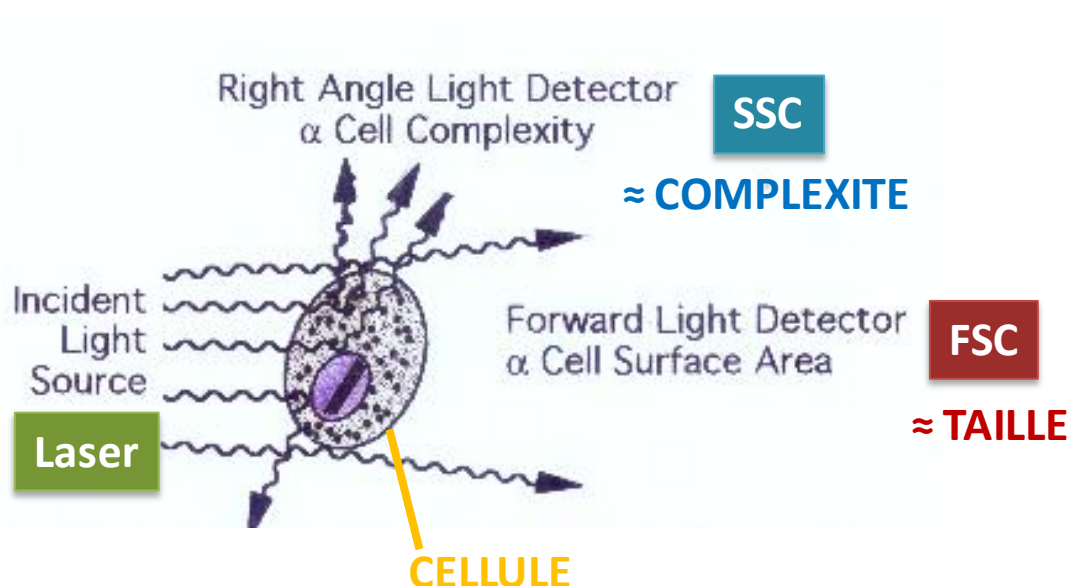


Figure 27: Diffraction de la lumière émise par le laser d'un cytomètre en flux lorsqu'elle rencontre une cellule. La diffraction aux petits angles (Forward Scatter = FSC) reflète la taille de la cellule alors que celle aux grands angles (Side Scatter = SSC) reflète sa complexité.

### 1.5.2 PROTOCOLE

Lors d'analyses en routine, l'étude du contenu en ADN, ou ploïdie, des cellules d'hémolymph de coques a été réalisée par cytométrie en flux, afin de diagnostiquer et de déterminer l'intensité de la néoplasie disséminée. Ces analyses ont été réalisées sur les 1838 échantillons d'hémolymph de coques sélectionnés pour les deux études (suivi saisonnier et étude « surface-profondeur ») sur le cytomètre en flux de type FacsCalibur, BD Biosciences, appartenant au LEMAR (UMR CNRS 6539).

La méthode qui a été suivie est celle décrite par da Silva et al. (2005). Les cellules de l'hémolymph ont tout d'abord été fixées à l'éthanol afin de perméabiliser leur membrane. Pour cela, une partie de l'hémolymph est transférée, individuellement, de la seringue, toujours maintenue dans la glace, dans un microtube et diluée à 1/5 avec de l'éthanol absolu, préalablement placé à -20°C. Le tout a été homogénéisé délicatement à l'aide d'une micropipette, par aspiration-refoulement. Les volumes couramment utilisés étaient de 100 µL d'hémolymph pour 400 µL d'éthanol. Les microtubes ont alors été stockés à -20°C pour analyse ultérieure.

Au moment de l'analyse des échantillons en cytométrie en flux, les microtubes ont été agités délicatement par retournement et 300 µL d'hémolymph diluée contenue dans ces microtubes ont été transférés dans un autre microtube, puis centrifugés à 400 *g*, pendant 10 min, à température ambiante. Le surnageant d'éthanol a été enlevé et le culot d'hémocytes resuspendu dans 1 mL de PBS (Saline Phosphate Buffer) 0.01M pH 7.4, préalablement mis à température ambiante. Après homogénéisation, délicatement à l'aide d'une micropipette, réhydratation 30 minutes à température ambiante puis centrifugation à 400 *g*, pendant 10 min, à température ambiante, le surnageant de PBS a été enlevé. Le culot d'hémocytes a été resuspendu, dans 500 µL de PBS 0.01M pH 7.4 puis homogénéisé. Le contenu du microtube a ensuite été transféré dans un tube adapté pour analyse en cytométrie en flux, après avoir été filtré à 80µm. Cette filtration a permis d'éliminer les éventuels agrégats formés au cours des différentes centrifugations. Le marquage de l'ADN a été effectué en ajoutant à chaque

## *Matériel et méthodes*

tube 25  $\mu\text{L}$  d'iodure de propidium (IP,  $1\text{mg.mL}^{-1}$ ) et 2.5  $\mu\text{L}$  RNase (DNase free) ( $10\text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les tubes ont été mis à incuber 1 h à température ambiante, à l'obscurité. L'acquisition des données est réalisée pendant 60 sec ou 50000 événements, en débit « high » (environ 60  $\mu\text{L.min}^{-1}$ ).

### 1.5.3 TRAITEMENT DES DONNEES

La détermination du contenu en ADN des cellules est basé sur les propriétés de l'IP, un composé fluorescent ( $\lambda_{\text{absorbance}} = 536\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 617\text{nm}$ ) qui marque l'ADN et l'ARN en s'intercalant dans les doubles brins d'acides nucléiques. L'ajout de RNase, en détruisant l'ARN, permet de ne marquer que l'ADN. La fluorescence émise par l'IP est proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans chaque cellule (Krishan, 1975). La fluorescence de l'IP est détectée sur le détecteur FL2 (fluorescence rouge).

L'analyse des données a été réalisée comme décrit par da Silva et al. (2005). Pour chaque événement passant devant le laser, un pulse est créé en FL2. Ce pulse est caractérisé par trois paramètres : son aire, sa hauteur et sa largeur (Figure 28B). L'aire du pulse, proportionnelle à l'intensité de la fluorescence, et donc à la quantité d'ADN, est la variable utilisée pour le calcul du contenu en ADN. Cependant, malgré l'étape de filtration qui a permis d'éliminer les agrégats de cellules, il est possible que des doublets subsistent dans le mélange, faisant ainsi passer deux cellules devant le laser. Afin d'éviter tous biais dans les résultats, cette éventualité doit être prise en compte. La première étape dans l'analyse des données consiste donc à sélectionner uniquement les pulses produits par des cellules isolées. Les pulses produits par des doublets ou groupes de plusieurs cellules se distinguent de ceux produits par des cellules isolées par leur plus grande largeur (Figure 28A).

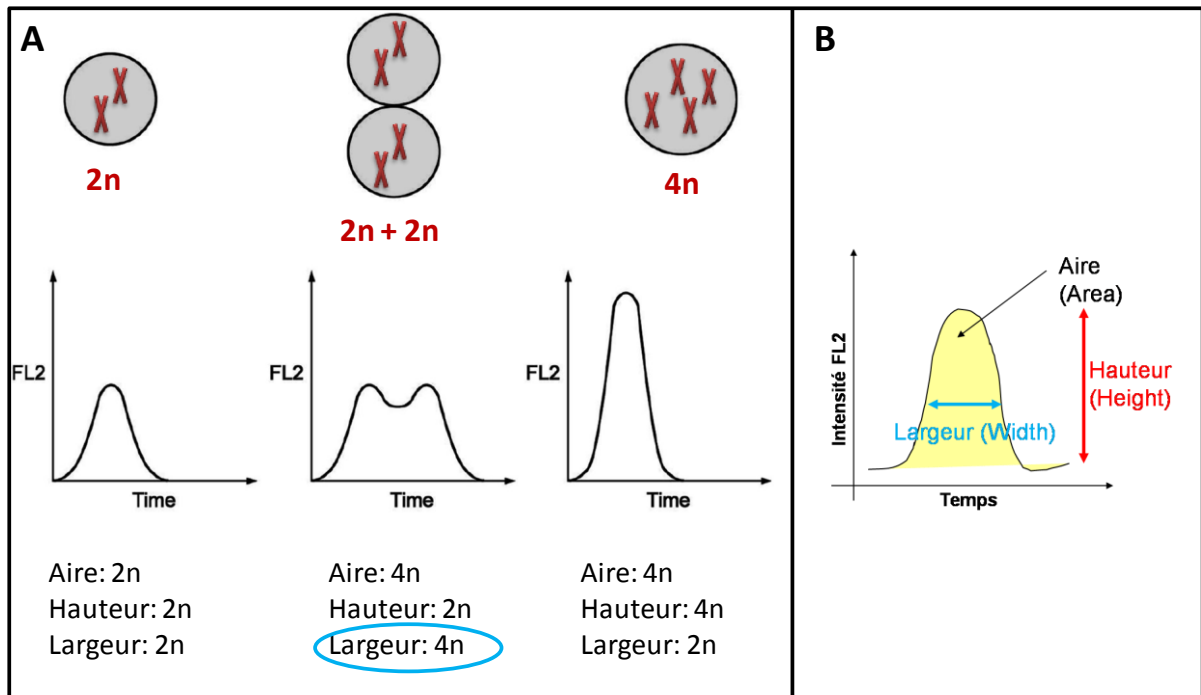


Figure 28: Méthode de discrimination des doublets basée sur l'analyse de la hauteur, de la largeur et de l'aire des signaux de fluorescence FL2 relatifs au contenu en ADN. A : Valeurs de l'aire et de la hauteur du pulse en fonction du type de cellule analysé (cellule normale isolée, doublet de cellules normales ou cellule isolée en mitose. B : Paramètres caractérisant le signal créé par l'analyse d'une cellule par cytométrie en flux (aire, hauteur et largeur).

Ainsi, sur un cytogramme « density plot » représentant l'aire des pulses en fonction de leur largeur, on peut sélectionner dans une région (R1) ceux présentant une largeur « normale », produits par des cellules isolées (Figure 29A). Ceux produits par des doublets, ou des groupes de plusieurs cellules ont une largeur supérieure et se trouvent à droite de la région R1. Les aires de ces pulses sélectionnés dans R1, correspondant à des cellules isolées, sont alors reportées sous forme d'histogramme (Figure 29B, Figure 30B).

Cet histogramme permet, pour chaque coque, d'estimer la ploïdie des cellules présentes dans son hémolymph. Chaque pic représente une population de cellules ayant une même ploïdie. La valeur du paramètre FL2 (l'abscisse) de chaque pic est une valeur arbitraire, proportionnelle à la ploïdie. Pour un pic présentant une valeur de FL2 donnée, la ploïdie est déterminée par rapport à la valeur de FL2 d'un pic de référence, correspondant à des hémocytes diploïdes de coques saines. Ainsi, par exemple, dans les Figure 29 et Figure 30, on observe des populations d'hémocytes normaux diploïdes ( $2n$ ) mais aussi des populations d'hémocytes dont les contenus en ADN sont 2.0 fois et 2.5 fois supérieurs à ceux des cellules diploïdes et qui sont donc respectivement tétraploïdes ( $4n$ ) et pentaploïdes ( $5n$ ). Il est important de remarquer que la ploïdie des cellules peut être différente d'une valeur entière et prendre des valeurs décimales variées, généralement arrondies au 10<sup>ème</sup> près ( $3.3n$ ,  $2.4n$ , ...).



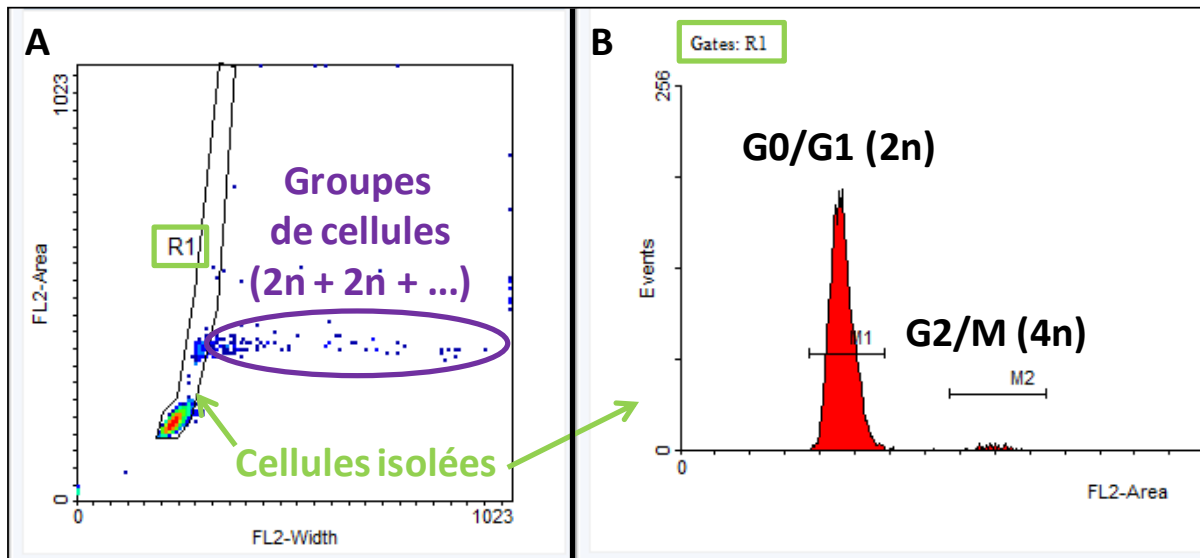


Figure 29 : A : « Density plot » représentant la largeur (FL2 width) et la surface (FL2 Area) des pulses produits par les hémocytes d'une coque saine marqués à l'iodure de propidium. Les cellules isolées sont regroupées dans la région 1 (R1). B : Histogramme de l'aire des pulses, proportionnelle à la ploïdie des cellules, correspondant aux cellules isolées sélectionnées à partir de la région R1 de la figure A. La majorité des cellules présentent un contenu en ADN diploïde (phase G0/G1). Une petite fraction des cellules présentent un contenu en ADN deux fois plus grand et sont tétraploïdes (phase G2/M).

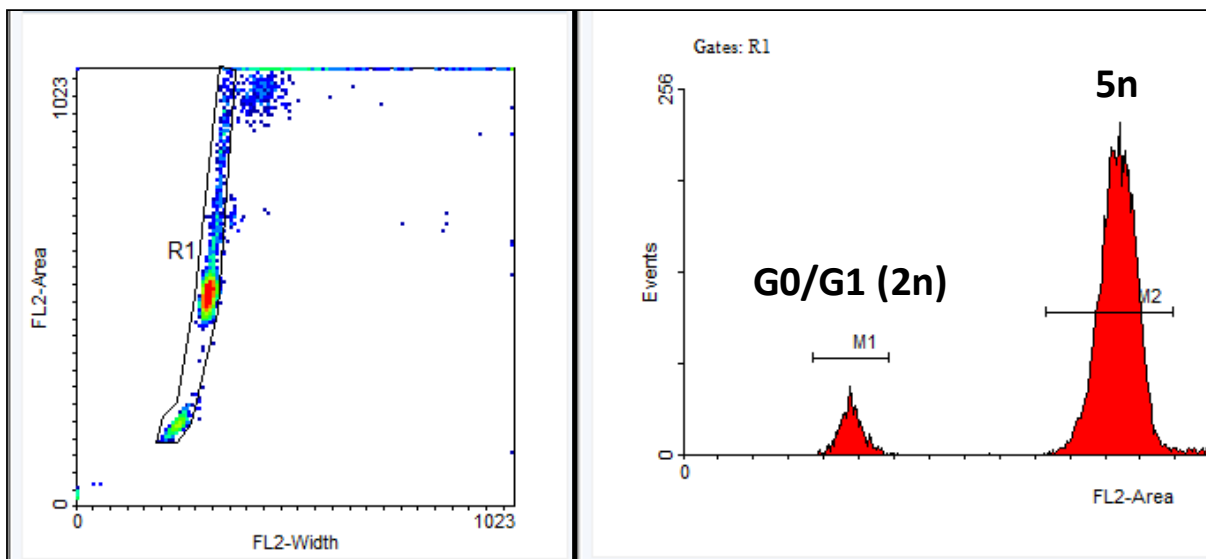


Figure 30 : A : « Density plot » représentant la largeur (FL2 width) et la surface (FL2 Area) des pulses produits par les hémocytes d'une coque néoplasique marqués à l'iodure de propidium. Les cellules isolées sont regroupées dans la région 1 (R1). B : Histogramme de l'aire des pulses, proportionnelle à la ploïdie des cellules, correspondant aux cellules isolées sélectionnées à partir de la région R1 de la figure A. Une petite fraction des cellules présente un contenu en ADN diploïdes (phase G0/G1). La majorité des cellules présentent un contenu en ADN 2.5 fois plus grand et sont pentaploïdes.

#### 1.5.4 CRITERES DE DIAGNOSTIC, DETERMINATION DE LA PREVALENCE ET DU STADE DE DEVELOPPEMENT (OU INTENSITE) DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE

La détermination de critères permettant le diagnostic et l'estimation du stade de développement de la néoplasie disséminée a fait l'objet d'une étude approfondie. Brièvement, la néoplasie disséminée est caractérisée par la présence de cellules aneuploïdes (ayant un contenu en ADN anormal, différent de  $2n$ ) dans l'hémolymphe. Plus la maladie se développe et gagne en intensité, plus la proportion des ces cellules augmente, par rapport aux hémocytes. Ainsi, il s'est agit de déterminer la proportion de cellules aneuploïdes dans l'hémolymphe.

La première étape a été de définir ce qu'était une cellule aneuploïde. Des analyses statistiques, menées sur les 1838 échantillons analysés en cytométrie de flux, ont montré que des cellules présentant une ploïdie comprise entre  $1.75n$  et  $2.25n$  pouvaient être considérées comme diploïdes (Figure 1, a-d, Le Grand et al. (2010)). Toute coque présentant une population de cellules ayant une ploïdie en dehors de cet intervalle a donc été considérée comme néoplasique.

La deuxième étape a été de discriminer des cellules normales diploïdes, mais en phase de mitose, et présentant donc un contenu en ADN transitoirement tétraploïde ( $2 \times 2n$ ), de cellules tétraploïdes ( $4n$ ) réellement néoplasiques. En effet, tous les échantillons, y compris ceux provenant de coques saines, comprenaient une part d'hémocytes en division (Figure 29B). Grâce à l'analyse des 1838 échantillons d'hémolymphe de coques par cytométrie en flux, un intervalle de confiance de ce pourcentage dans des coques saines a pu être établi : une coque présentant plus de 15% de cellules tétraploïdes est considérée comme néoplasique.

Dans chacune des deux études, suivi saisonnier et étude « surface-profondeur », pour chaque date et/ou position des coques dans le sédiment, la prévalence et l'intensité moyenne de la néoplasie disséminée ont été déterminées. La prévalence a été calculée comme étant le pourcentage de coques malades. L'intensité a été estimée, dans les coques

malades, comme étant le pourcentage moyen de cellules aneuploïdes, par rapport au total des cellules détectées dans l'hémolymphe par cytométrie en flux. Des stades de développement de la néoplasie disséminée ont également été déterminés, en fonction de cette intensité :

- Stade 0 (sain): hémolymphe contenant uniquement des cellules présentant une ploïdie comprise entre  $1.75n$  et  $2.25n$ , ou moins de 15% de cellules présentant une ploïdie comprise entre  $3.5n$  et  $4.5n$ .
- Stade 1 (légèrement malade) : hémolymphe contenant jusqu'à 50% de cellules aneuploïdes.
- Stade 2 (modérément malade) : hémolymphe contenant de 50% à 75% de cellules aneuploïdes.
- Stade 3 (sévérement malade) : hémolymphe contenant plus de 75% de cellules aneuploïdes.

Toutes les informations obtenues par cytométrie en flux sur le contenu en ADN des cellules circulantes de coques néoplasiques, du suivi saisonnier et de l'étude « surface-profondeur », ont été regroupées ( $n=143$ ) et utilisées pour une étude détaillée du contenu en ADN des cellules néoplasiques chez la coque *C. edule*.

## 2 DIAGNOSTIC DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE CHEZ LA MYE DE L'ILE DU PRINCE EDOUARD

Le diagnostic de la néoplasie disséminée a également été réalisé sur des myes (*Mya arenaria*), par cytométrie en flux (cytomètre FacsCalibur, BD Biosciences appartenant au département de Pathologie et de Microbiologie de l'Université de l'île du Prince Edouard), en suivant le protocole énoncé pour les coques. Trois cent myes ont été collectées en mai 2008 sur le site de « North River » sur l'île du Prince Edouard, au Canada (Figure 31). L'hémolymphe de chacune de ces myes a été prélevée au niveau du muscle adducteur à l'aide d'une aiguille stérile hypodermique (calibre 20) montée sur une seringue en plastique de 2 mL. L'étude de la néoplasie disséminée dans le cas des myes de l'île du Prince Edouard a uniquement été réalisée dans le but d'obtenir un diagnostic individuel vis-à-vis de la maladie, afin de grouper les myes en fonction de leur état de santé en vue d'analyses ultérieures (lipidiques et fonctionnelles).

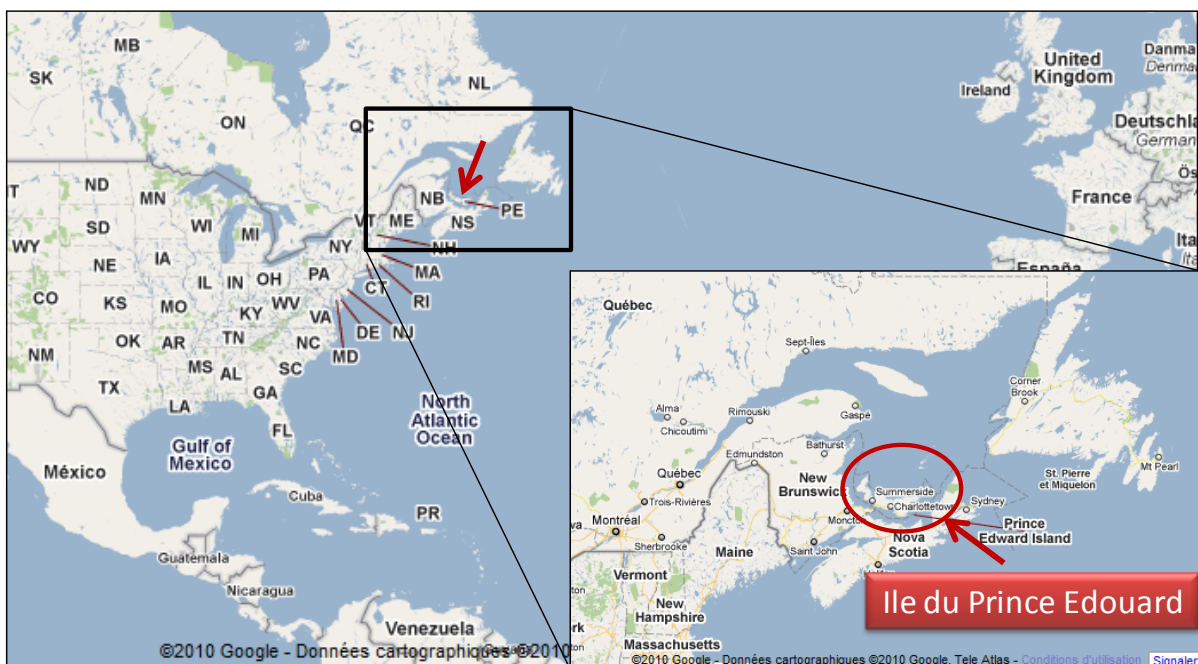


Figure 31: Site de prélèvement des myes (North River, île du Prince Edouard, Canada)

### **3 ETUDE DES PARAMETRES FONCTIONNELS DES CELLULES IMMUNITAIRES DE BIVALVES PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

Différents paramètres descriptifs et fonctionnels des hémocytes ont été évalués par cytométrie en flux, sur les coques et les myes : i) des variables descriptives (concentration cellulaire (THC) et mortalité cellulaire) et ii) des variables fonctionnelles (capacité de phagocytose, et production d'espèces oxygénées réactives (ERO). L'ensemble de ces paramètres est analysé sur des cellules vivantes. Les méthodologies appliquées sont celles décrites par Haberkorn et al. (2009) et Paul-Pont et al. (2009).

### 3.1 COQUES

#### 3.1.1 SELECTION DES INDIVIDUS ET PRELEVEMENTS D'HEMOLYMPHE

Les échantillons d'hémolymphe utilisés proviennent de coques sélectionnées parmi les 500 prélevées sur le Banc d'Arguin en mars 2009. Sur chacune de ces 500 coques, un peu d'hémolymphe (200  $\mu$ L maximum) a été prélevé. Une fraction a été immédiatement observée en microscopie optique afin d'obtenir pour chaque individu un diagnostic vis-à-vis de la néoplasie disséminée. Une fois le diagnostic de ces 500 coques établi, tous les animaux malades (n=32) et un nombre équivalent d'individus sains (n=36), choisis aléatoirement, ont été sélectionnés pour les analyses de paramètres hématocytaires. Pratiquement, ces diagnostics ont été réalisés sur 3 jours. Ces trois journées ont été à chaque fois espacées d'une journée, durant laquelle les paramètres hématocytaires sont analysés sur des coques diagnostiquées la veille. Cette stratégie a été choisie en raison de la faible espérance de vie des coques néoplasiques, surtout après avoir été stressées par les manipulations et les prélèvements.

Durant les journées d'analyse des paramètres hématocytaires, l'hémolymphe de ces 68 animaux a été prélevée (le volume maximal possible). L'hémolymphe de chaque échantillon a été filtrée à 80 $\mu$ m et transférée individuellement dans des microtubes 1.5 mL, maintenus dans la glace afin d'éviter l'aggrégation des hématocytes. Pour chaque échantillon, 100  $\mu$ L d'hémolymphe a été transféré dans un autre microtube, contenant 300  $\mu$ L d'éthanol, afin de pouvoir réaliser ultérieurement un diagnostic de néoplasie disséminée par cytométrie en flux, et ainsi valider celui effectué précédemment en microscopie optique.

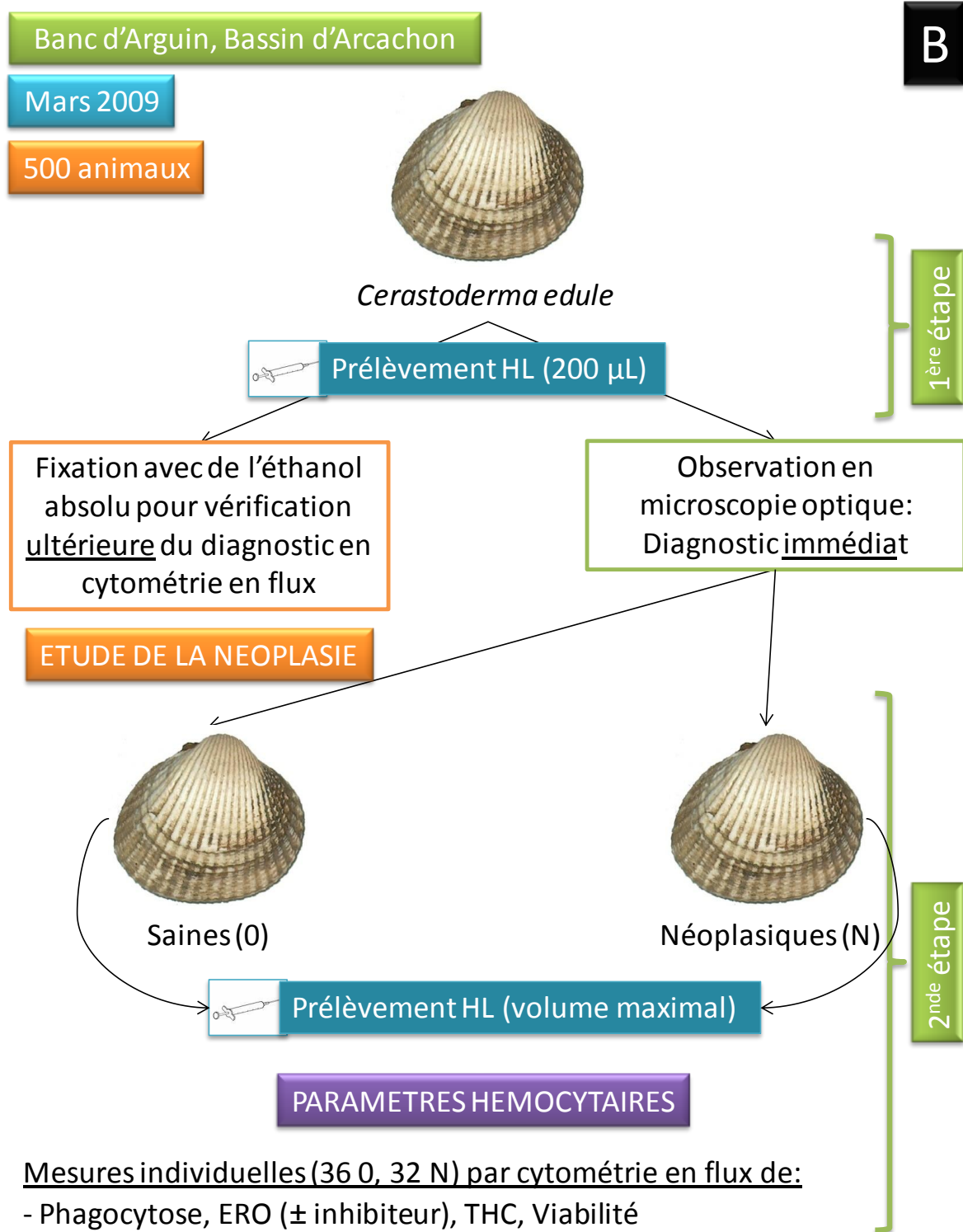


Figure 32: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) de coque, en mars 2009, pour l'étude de la néoplasie et l'analyse des paramètres hémodocytes.

---

### 3.1.2 ANALYSES DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES

Les analyses individuelles de chacun des paramètres hémocytaires ont été réalisées grâce au cytomètre en flux de type Guava, Milipore, appartenant au LEMAR (UMR CNRS 6539). Cet appareil étant équipé d'un passeur automatique, les analyses sont réalisées à partir de plaques de 96 puits. En raison de la capacité de ces puits, les volumes d'analyses ont été modifiés par rapport à ceux utilisés dans Haberkorn et al. (2009) et Paul-Pont et al. (2009), et ajustés à 200  $\mu\text{L}$ .

#### 3.1.2.1 VIABILITÉ

---

100  $\mu\text{L}$  d'une solution antiagrégante pour hémocytes de bivalves (Auffret and Oubella, 1997) ont été ajoutés à 50  $\mu\text{L}$  d'eau de mer stérile filtrée (EMSF) et à 50  $\mu\text{L}$  d'hémolymphe. Les échantillons ont ensuite été mis à incuber pendant 2 h à 18°C dans le noir, en présence de 2  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA, solution commerciale diluée à 0.1% dans de l'EMSF), et de 2  $\mu\text{L}$  de iodure de propidium (IP; SIGMA, Saint Quentin Fallavier, France, dilué à 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dans de l'EMSF). Le SYBR Green et l'IP marquent spécifiquement les acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN. L'IP ne peut rentrer que dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, et qui sont donc considérées comme mortes. Au contraire, le SYBR Green marque toutes cellules, qu'elles soient vivantes ou mortes. Le SYBR Green I émet une fluorescence verte mesurée à 500-530 nm et l'IP émet une fluorescence rouge mesurée à 550-600 nm. Sur un cytogramme où sont représentés les hémocytes en fonction de leurs fluorescences vertes (SYBR Green) et rouges (IP), le pourcentage de cellules mortes est calculé en divisant le nombre de cellules marquées à la fois par l'IP et le SYBR Green (cellules mortes) par le nombre total de cellules marquées au SYBR Green (cellules vivantes et mortes) (Figure 33).



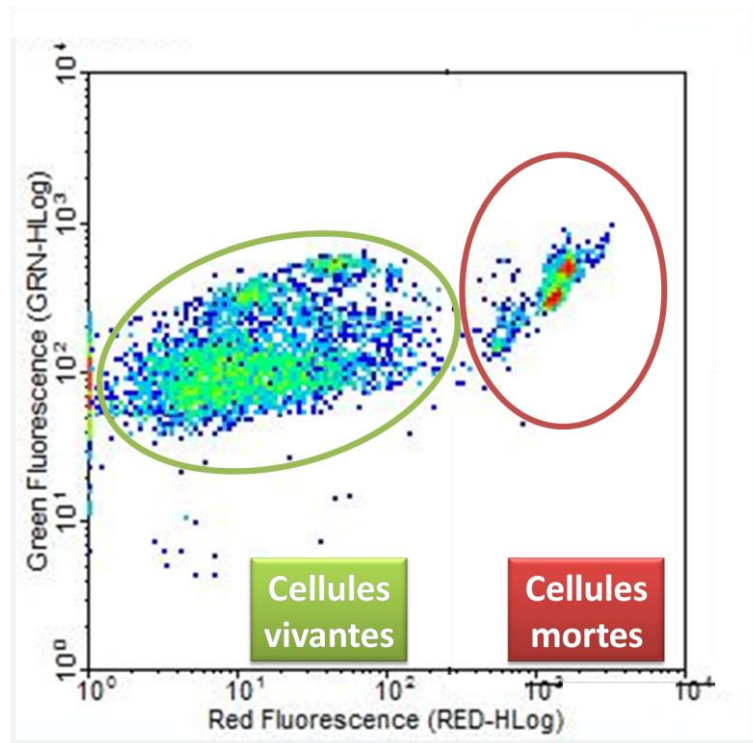


Figure 33: Cytogramme « density plot » représentant les hémocytes de coque en fonction de leurs fluorescences verte et rouge, après marquage au SYBR Green et à l'IP. Les hémocytes morts, marqués à la fois par le SYBR Green et l'IP présentent des intensités de fluorescence verte et rouge élevées, alors que les hémocytes vivants, marqués uniquement par le SYBR Green présentent une intensité de fluorescence verte élevée mais une intensité de fluorescence rouge faible.

### 3.1.2.2 CONCENTRATION HEMOCYTAIRE (THC)

50  $\mu$ L d'hémolymphe sont fixés avec 100  $\mu$ L de formol 6% et 50  $\mu$ L d'EMSF. Après ajout de 2  $\mu$ L de SYBR Green I, les échantillons sont mis à incuber 30 minutes à l'obscurité avant analyse par cytométrie en flux. Sur le cytogramme résultant de cette analyse, représentant les hémocytes en fonction de leur fluorescence verte, due au marquage au SYBR Green, et de leur « complexité » (SSC), le nombre d'hémocytes analysés est déterminé (Figure 34). Ce résultat, combiné avec le temps d'analyse et le débit du cytomètre en flux, permet de calculer la concentration hémocytaire totale (THC).

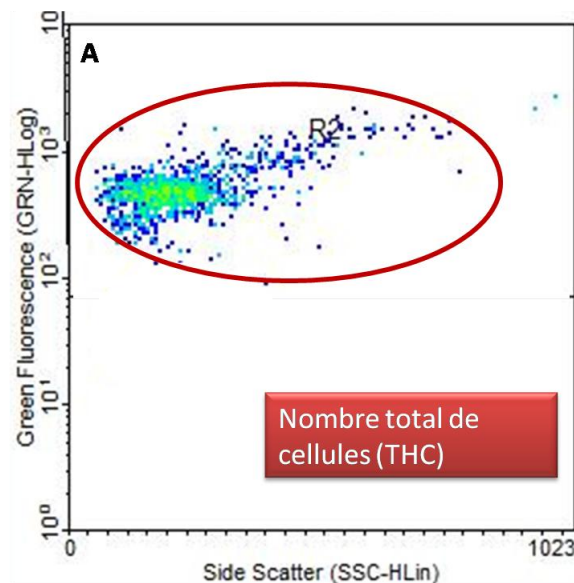


Figure 34: Cytogramme « density plot » représentant les hémocytes de coque en fonction de leurs fluorescence verte et de leur « complexité » (SSC), après marquage au SYBR Green et fixation dans du formol 6%.

### 3.1.2.3 ACTIVITÉ PHAGOCYTAIRE

50  $\mu$ L d'hémolymph, dilués dans 100  $\mu$ L d'EMSF ont été mis en contact avec 15  $\mu$ L d'une solution de travail de billes fluorescentes en latex (2  $\mu$ m jaune-vert, Fluoresbrite; Polysciences, Eppelheim, Germany; diluées à 2% dans de l'EMSF). Les échantillons ont ensuite été mis à incuber 2 h à 18 °C à l'obscurité puis mis dans de la glace afin de bloquer la phagocytose en attendant l'analyse par cytométrie en flux. Les billes émettent une fluorescence verte détectée à 500-530 nm. Sur un histogramme est représenté le nombre d'hémocytes en fonction de leur fluorescence verte, proportionnelle au nombre de billes adhérentes ou « ingérées ». L'activité phagocytaire est déterminée comme le pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté plus de 3 billes (Delaporte et al., 2003) (Figure 35). Ce seuil a été déterminé empiriquement pour différencier les cellules ayant activement ingéré des billes de celles sur lesquelles des billes ont seulement adhéré.

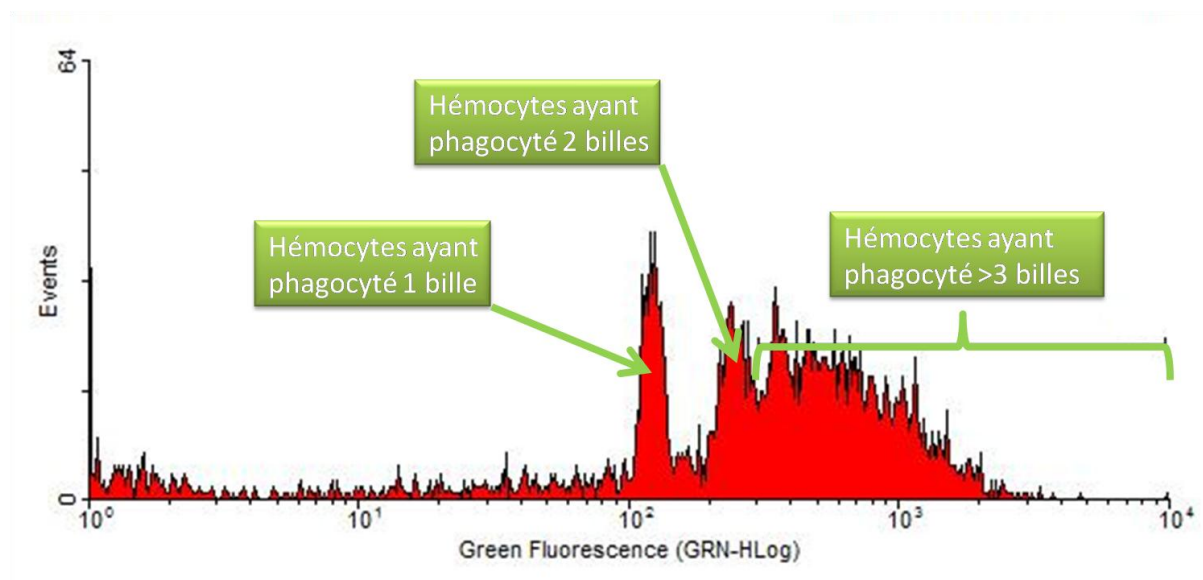


Figure 35: Histogramme représentant le nombre d'hémocytes de coques en fonction de leur fluorescence verte, associée à l'ingestion des billes de latex. L'activité phagocytaire est déterminée comme le pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté plus de 3 billes.

#### **3.1.2.4 PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO)**

---

70  $\mu$ L d'hémolymphe ont été dilués dans 130  $\mu$ L d'EMSF et 2  $\mu$ L d'une solution de 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (concentration finale de 0.01 mM) ont été ajoutés à ce mélange. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 2 h à 18 °C. Après incorporation dans la cellule, le DCFH-DA est clivé en DCFH, une molécule non fluorescente. Le DCFH est oxydé en DCF, une molécule fluorescente, en présence de ERO. L'intensité de la fluorescence verte est donc proportionnelle à la quantité de DCF formée, elle-même proportionnelle à la quantité d'ERO intracellulaire. Cette fluorescence est mesurée à 500-530 nm par cytométrie en flux. La production d'ERO est calculée comme la moyenne géométrique de cette fluorescence verte et est exprimée en unité arbitraire (Figure 36). La production spécifique d'ERO mitochondriaux a pu être mesurée, lors d'une autre analyse, par l'addition de carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone (CCCP) au mélange hémolymphe/EMSF (final concentration of 0.01 mM) avant l'ajout du DCFH-DA. Le CCCP est un protonophore qui annule le potentiel mitochondrial et inhibe la production d'ERO d'origine mitochondriale (Smiley et al., 1991; Salvioli et al., 1997).

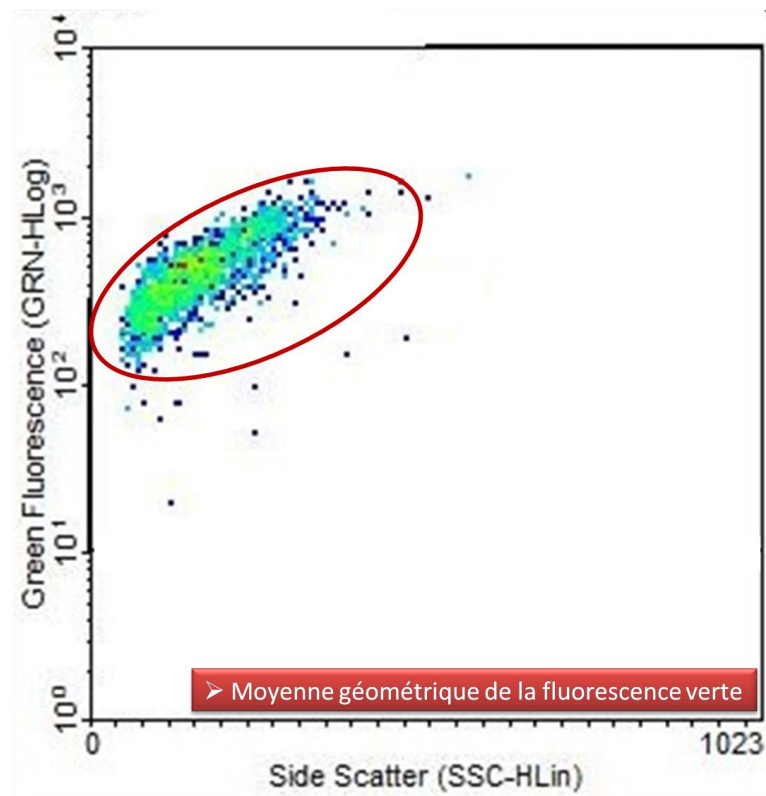


Figure 36: Cytogramme « density plot » représentant les hémocytes de coques en fonction de leur « complexité » et de leur fluorescence verte due à l'ajout de DCFH-DA et proportionnelle à la quantité d'ERO intracellulaires. La quantité d'ERO est calculée comme la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence verte (unités arbitraires).

## 3.2 MYES

### 3.2.1 SELECTION DES INDIVIDUS ET PRELEVEMENT DE L'HEMOLYMPHE

L'analyse des paramètres hématocytaires de myes a été réalisée par cytométrie en flux (cytomètre FACS Calibur, BD Biosciences appartenant au département de Pathologie et de Microbiologie de l'Université de l'île du Prince Édouard) sur les individus échantillonnés en mai 2008, sur l'île du Prince Édouard, au Canada. Le diagnostic de néoplasie disséminée a d'abord été effectué sur 300 myes (Figure 37). Durant la période de diagnostic (3 jours), les myes, numérotées individuellement ont été stockées dans des bacs alimentés en eau de mer courante. Une fois tous les diagnostics réalisés, les analyses des paramètres hématocytaires ont été effectuées. Cette stratégie, différente de celle utilisée pour les coques, a été adoptée en raison de la résistance au stress des myes néoplasiques relativement élevée. Ces analyses ont été réalisées sur pratiquement toutes les myes diagnostiquées comme néoplasiques (n=52 sur 62), se répartissant en 36 myes modérément malades et 16 myes sévèrement malades, et sur 36 myes saines.

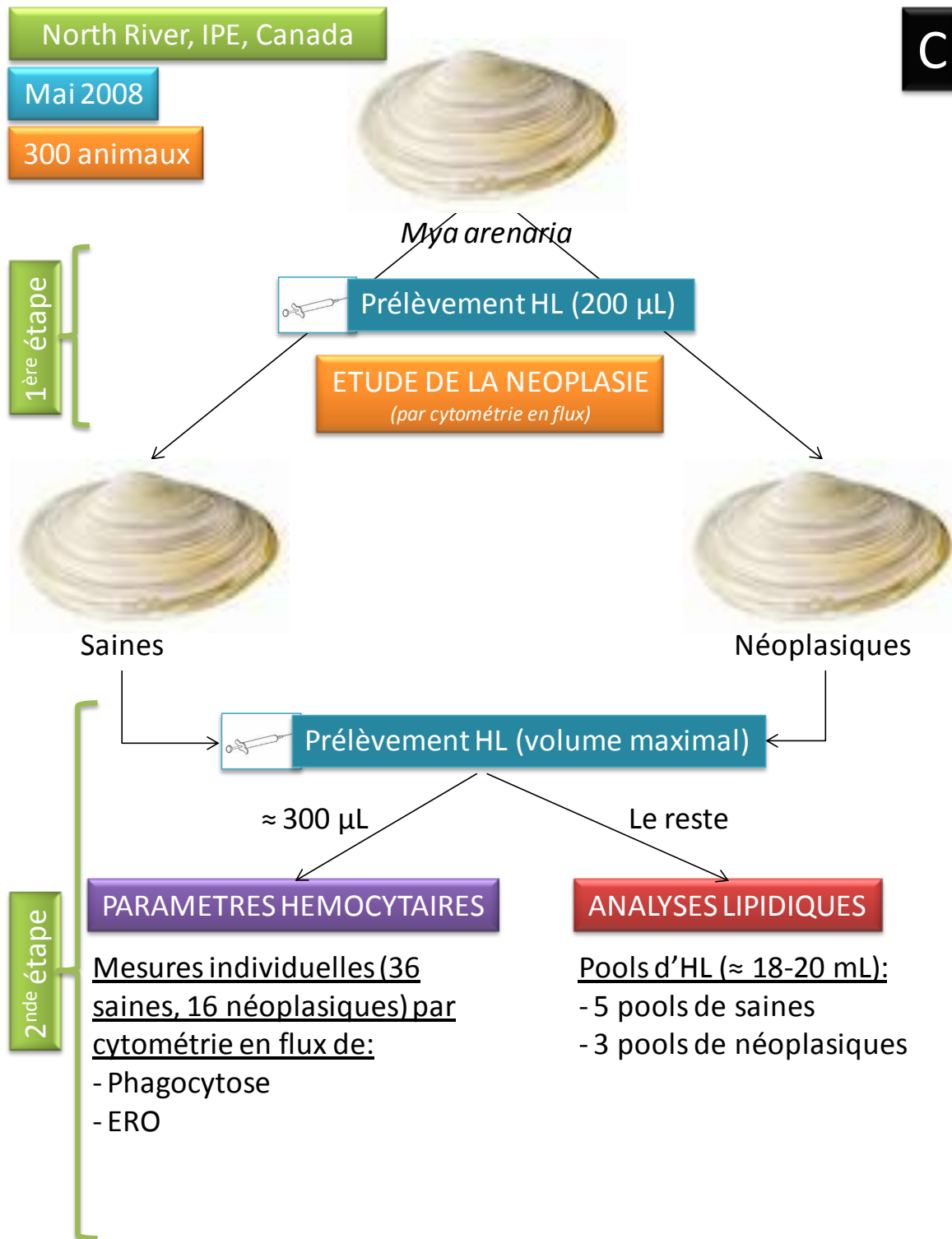


Figure 37: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymphe (HL) de mye, en mai 2008, pour l'étude de la néoplasie, les analyses lipidiques et l'analyse des paramètres hémocytaires.

---

### **3.2.2 MESURE DES PARAMETRES HEMOCYTAIRES**

Les analyses des paramètres hémocytaires ont été réalisées comme décrit chez les coques. Ces analyses ont été effectuées grâce à un cytomètre en flux de type FacsCalibur (BD Biosciences). Contrairement au Guava, qui permet d'analyser des échantillons d'un volume de 200  $\mu$ L contenus dans des microplaques 96 puits, ce cytomètre est conçu pour analyser un par un des volumes supérieurs d'échantillon (400  $\mu$ L minimum). Les volumes utilisés pour les analyses ont donc été multipliés par deux, par rapport à ceux utilisés dans le cas de coques. Les paramètres hémocytaires analysés sur le modèle mye ont été limités à l'activité phagocytaire et à la production d'ERO. Ces deux derniers paramètres ont été analysés comme décrit pour les coques.





## 4 ANALYSE DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE DES HEMOCYTES

### 4.1 PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS D'HEMOLYMPHE POUR L'EXTRACTION DES LIPIDES DES HEMOCYTES

#### 4.1.1 ORIGINE DES ÉCHANTILLONS D'HÉMOLYMPHE

Les analyses lipidiques ont été réalisées sur des hémocytes de coques, de myes, d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et de palourdes (*Ruditapes philppinarum*). Dans le cas de la coque et de la mye, ces analyses ont été effectuées sur des hémocytes provenant d'individus sains et néoplasiques, après diagnostic de la néoplasie disséminée par observation directe de l'hémolymphe en microscopie optique dans le cas des coques et par cytométrie en flux dans le cas des myes.

##### 4.1.1.1 COQUES SAINES ET NEOPLASIQUES

Lors de chaque point du suivi saisonnier de la néoplasie disséminée affectant les coques du bassin d'Arcachon, un volume maximal d'hémolymphe d'animaux sains et néoplasiques a été prélevé en vue d'analyses lipidiques (Figure 38). Seuls les résultats concernant les échantillons d'octobre 2007 seront présentés ici. Le stade de développement de la maladie a d'abord été déterminé par observation en microscopie optique d'hémolymphe brute, au moment des prélèvements d'hémolymphe. Les individus sélectionnés pour les analyses lipidiques étaient les individus sains, dont l'observation de l'hémolymphe n'a pas permis de mettre en évidence la présence de cellule anormale, et les

individus néoplasiques de stade très avancés (stade 3) dont l'hémolymph présentait un aspect laiteux du fait de la très grande densité des cellules anormales. Pour chaque échantillon, 100  $\mu\text{L}$  d'hémolymph a été dilué au 1/5 dans de l'éthanol absolu et stocké à -20°C afin d'effectuer un diagnostic ultérieur plus précis par cytométrie en flux. Le reste de l'hémolymph a été utilisé pour les analyses lipidiques.

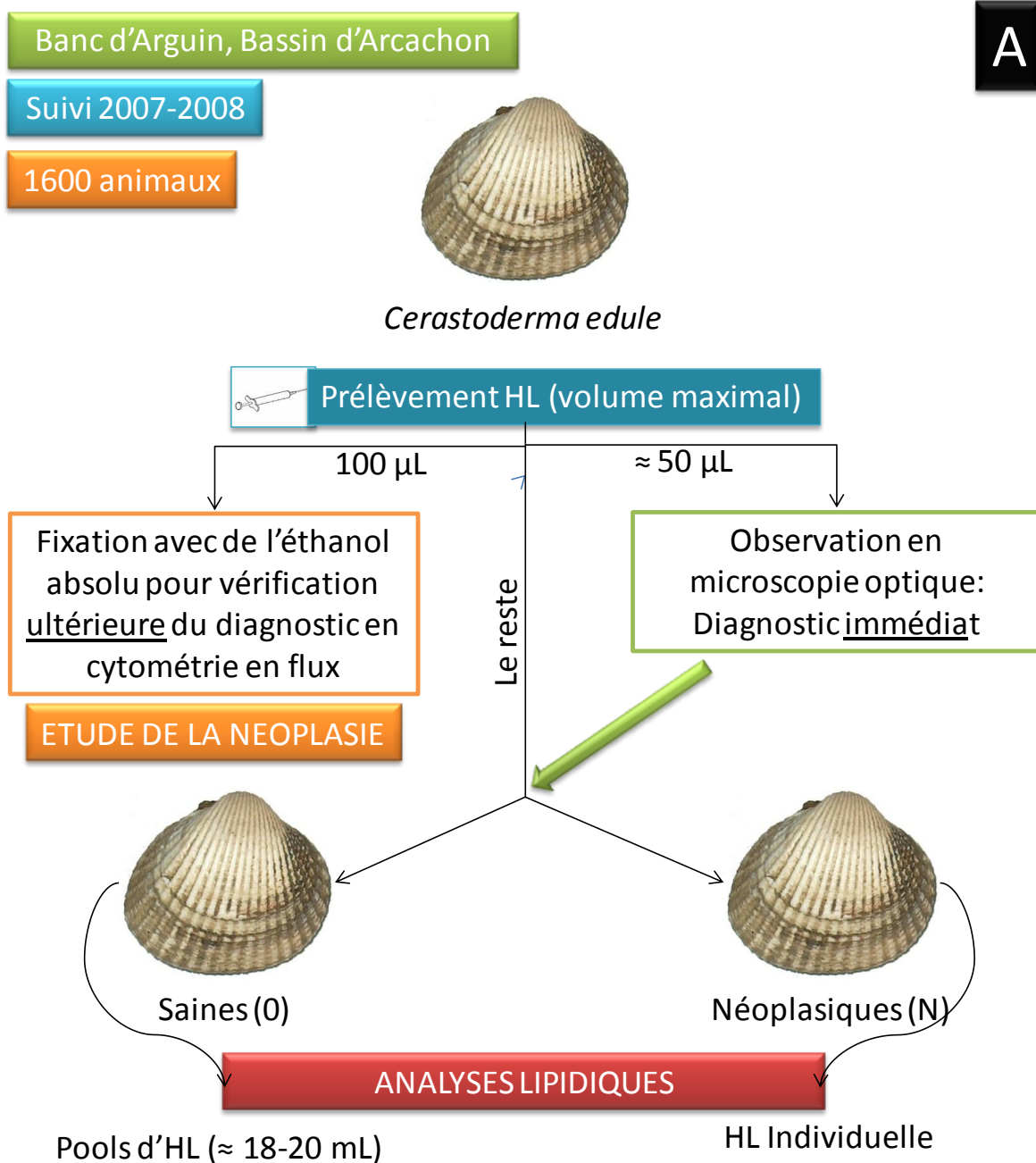


Figure 38: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) de coque, durant le suivi saisonnier 2007-2008, pour l'étude de la néoplasie et les analyses lipidiques.

#### **4.1.1.2 MYES SAINES ET NEOPLASIQUES**

---

Les myes utilisées pour les analyses lipidiques des hémocytes sont celles collectées en mai 2008 sur l'île du Prince Edouard, au Canada. Pour chacune des 300 myes, 200  $\mu$ L d'hémolymphes ont été prélevés et le stade de développement de la maladie a été déterminé par cytométrie en flux. Une fois tous les diagnostics effectués, l'hémolymphes des myes saines et des myes néoplasiques de stade très avancé a été prélevée une seconde fois (volume maximal) et a été utilisée en partie (environ 300  $\mu$ L) pour des analyses fonctionnelles. Le reste de l'hémolymphes a été utilisé pour les analyses lipidiques.

#### **4.1.1.3 PALOURDES ET HUITRES SAINES**

---

200 palourdes ont été collectées en décembre 2006 à Landéda (Finistère) et 200 huîtres en janvier 2007 à Plougastel (Finistère). Un volume maximal de leur hémolymphes a été prélevé, en suivant la méthode utilisée pour les coques, et a été entièrement employé pour les analyses lipidiques (Figure 39).

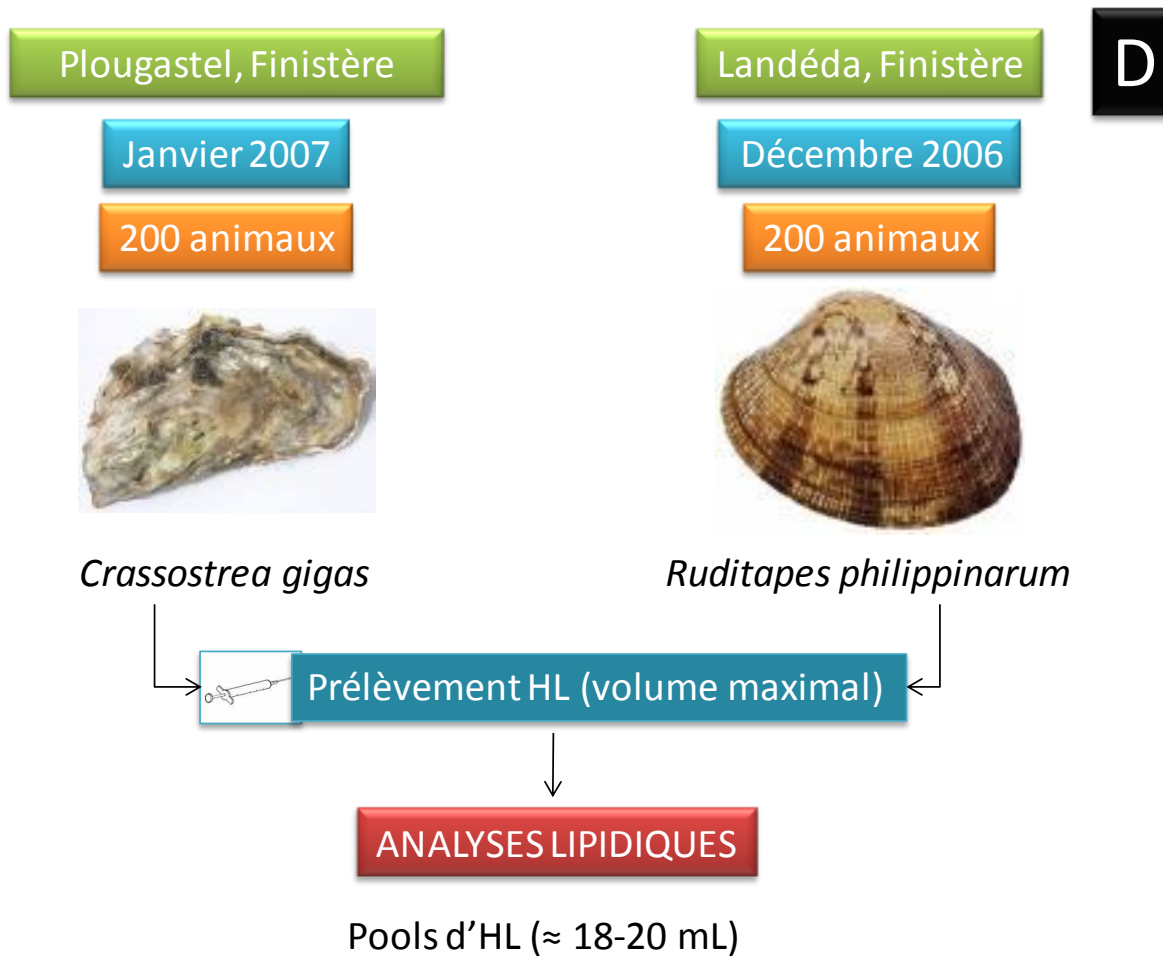


Figure 39: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) d'huître et de palourde, en janvier 2007 et décembre 2006 pour les analyses lipidiques.

#### 4.1.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS ET EXTRACTION DES LIPIDES

Il s'est avéré qu'une quantité minimum d'environ 10-20 millions de cellules était nécessaire pour permettre une analyse lipidique complète (détermination de la composition en acides gras des classes et sous-classes de phospholipides). Pour les hémocytes de coques, de myes, de palourdes et d'huîtres, ainsi que sur les cellules néoplasiques de myes, compte tenu des concentrations cellulaires dans l'hémolymphe qui sont de l'ordre de 1 million de cellules par mL, les analyses lipidiques ont été réalisées sur des pools d'individus. Celles menées sur les cellules néoplasiques de coques ont pu être réalisées au niveau individuel, compte tenu de concentrations cellulaires beaucoup plus importantes chez les coques néoplasiques de stade 3 ( $\approx 10$  millions de cellules par mL).

Une fois les échantillons d'hémolymphe filtrés sur soie 80 $\mu$ m, afin de les nettoyer d'éventuels débris de tissus ou gamètes, ils ont été poolés dans des tubes en verre de 20 mL, préalablement chauffés 6h à 450°C ou transférés de façon individuelle dans des microtubes préalablement rincés avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Ces tubes (de 17 mL et microtubes) ont été conservés dans la glace, jusqu'à centrifugation.

L'hémolymphe contenue dans chaque tube (pool et individuel) a d'abord fait l'objet de la détermination de sa concentration en hémocytes, par cellule de Mallassez.

Pour chaque échantillon, l'hémolymphe a été séparée en deux parties (culot = hémocytes et surnageant = plasma) par centrifugation (400 g, 15 min, 4°C). Une fois le surnageant retiré, le culot a été repris trois fois avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) et transféré dans un tube en verre de 7 mL. L'extraction des lipides est effectuée par l'addition de ce mélange de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) conformément à la méthode décrite par Folch et al. (1957), complétée par une sonication (5 x 10 min, à 4°C). Après ajout de 0.01% massique de butyl hydroxytoluène (BHT) comme antioxydant, les extraits ont été conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

## 4.2 SEPARATION LIPIDES NEUTRES / LIPIDES POLAIRES SUR MICROCOLONNE DE SILICE

La 1<sup>ère</sup> étape de l'analyse de la composition lipidique membranaire des hémocytes consiste à séparer les lipides polaires (lipides membranaires) des lipides neutres (lipides de réserve+stérols). Pour cela, l'échantillon a été évaporé à sec, repris par 3 x 500 µL de chloroforme/méthanol (98:2, v/v) et déposé en tête d'une microcolonne de silice (30x5 mm, Kiesegel Merck 70-230 mesh, préalablement chauffée à 450°C et désactivée avec 6% massique d'eau) (Marty et al., 1992). Les lipides neutres (triglycérides, stérols libres, et esters de stérols) ont été élués à l'aide de 10 mL de chloroforme/méthanol (98:2, v/v), les lipides polaires (glycolipides, phospholipides et sphingolipides) ont ensuite été récupérés par 20 mL de méthanol. Les fractions lipides neutres et polaires ont été collectées dans des tubes en pointe contenant 20 µg de BHT, comme antioxydant et conservées à -20°C pour analyse ultérieure. 1/10 de la fraction lipides polaires et 1/10 de la fraction lipides neutres ont été directement transestérifiés. Les 9/10 restants ont été utilisés, dans le cas des lipides polaires pour les différentes méthodes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) employées en vue de l'analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides, et dans le cas des lipides neutres, pour la séparation des différentes classes de lipides neutres par chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP).

## 4.3 SEPARATION DES CLASSES DE LIPIDES POLAIRES PAR CLHP

La séparation des différentes classes et sous-classes de phospholipides a été réalisée en combinant deux séparations CLHP successives utilisant deux phases mobiles différentes.

### 4.3.1 PREMIERE SEPARATION : HPLC SANS ACIDE

Cette séparation, qui a été réalisée suivant la méthode de Soudant et al. (2000), a été modifiée afin de réaliser une séparation plus rapide. Elle a été effectuée sur une colonne de silice greffée OH (Lichrosorb Diol, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm ID, Merk) et la phase mobile binaire utilisée était composée d'un mélange de solvants A (hexane/isopropanol/eau, 40:50:1, v/v/v) et d'un mélange de solvants B (hexane/isopropanol/eau, 40:50:8, v/v/v) à un débit de 1mL.min<sup>-1</sup>. Chronologiquement, un mélange 9:1 (solvant A:solvant B) a tout d'abord été maintenu durant les 11 premières minutes. Un gradient de polarité entre ce mélange et le solvant B pur a ensuite été effectué en 1 minute. Enfin, l'élution par le solvant B a été maintenue pendant 18 minutes avant de retourner au mélange initial 9:1 (solvant A:solvant B) pendant 20 minutes afin de réactiver la colonne. La séparation a été réalisée à température ambiante et les classes de phospholipides ont été détectées à 205nm.

Deux fractions ont ainsi été séparées : (1) une fraction F1 entre 3 et 20 minutes dans laquelle la phosphatidyléthanolamine (PE, diacyl + alkyl + plasmalogène), la phosphatidylcholine (PC, diacyl + alkyl + plasmalogène), le cardiolipide (CL) et le céramide aminoéthylphosphonate (CAEP) étaient présents et (2), une fraction F2 entre 20 et 25 minutes comportant la lyso-PC naturelle (LysoPC), la phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS, diacyl + alkyl + plasmalogène).



#### 4.3.2 DEUXIEME SEPARATION : HPLC AVEC ACIDE

Cette séparation est basée, comme il est décrit dans Kraffe et al. (2002) sur l'utilisation d'une seule colonne silice greffée OH (Lichrosorb Diol, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm ID, Merk) et d'une phase mobile binaire composée d'un solvant A (acétonitrile) et d'un mélange ternaire (solvant B) (acétonitrile/méthanol/acide phosphorique, 93:5:1,5, v/v/v). La séparation s'est faite selon un gradient de solvant B, à un débit de 1mL.min<sup>-1</sup>. Les fractions F1 et F2, après avoir été évaporées à l'aide d'une centrifugeuse sous vide (Speed-Vac) connectée à une arrivée d'azote, ont été reprises par 2 fois 50  $\mu$ L de mélange chloroforme/méthanol (98:2, v/v) et injectées dans la boucle de 200  $\mu$ L du système CLHP. La séparation a été réalisée à température ambiante et les classes de phospholipides ont été détectées en U.V. à 205nm. Cette séparation, basée sur l'utilisation d'une phase mobile acide (acide phosphorique), a permis l'hydrolyse de la liaison vinyl-éther en *sn*-1 du glycérol des formes plasmalogènes de la PC, de la PE et de la PS.

Les formes lyso-dérivées issues de la PE plasmalogène (PEplsm), de la PC plasmalogène (PCplsm) de la PS plasmalogène (PSplsm) ont alors été obtenues, ainsi que les formes diacyl+alkyl, qui elles n'ont pas subi l'hydrolyse. Chacune de ces 10 fractions a été collectée dans des tubes en verre de 7 mL contenant 2  $\mu$ g de BHT et 2.3  $\mu$ g de C23:0 (standard interne) en vue de la détermination et de la quantification des compositions en acides gras par chromatographie gazeuse (CPG).

## **4.4 ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS**

### **4.4.1 TRANSESTERIFICATION DES COMPOSES LIPIDIQUES**

Les fractions à analyser (lipides polaires totaux, lipides neutres totaux ou classes et sous-classes de phospholipides) ont été concentrées à l'aide d'une centrifugeuse sous vide. L'évaporation des fractions collectées en « CLHP acide » a été stoppée avant terme pour éviter toute dégradation due à la concentration de l'acide présent dans la phase mobile. La transestérification des acides gras associés a été obtenue par adjonction de MeOH/BF<sub>3</sub> (à 14% w/w), pendant 10 minutes à 95°C, comme décrit par Marty et al. (1992). Après refroidissement et ajout de 1,5 mL d'eau distillée, l'extraction des méthyl-esters d'acides gras (MEAG) a été effectuée par ajout de 800 µL d'hexane. Après agitation et centrifugation, la phase aqueuse a été éliminée. Chaque échantillon a ensuite subi deux lavages supplémentaires par ajout d'1,5 mL d'eau distillée avec élimination de la phase aqueuse, puis a été congelé pour éliminer les traces d'eau restantes. La phase organique (hexane) a alors été récupérée pour analyse en CPG.

Pour le CAEP l'acide gras étant lié par une liaison amide difficilement transestérifiable, les fractions CAEP issues de la « CLHP acide » ont donc été chauffées 5h en présence de MeOH/BF<sub>3</sub> (à 14% w/w), à 95°C (Morrison and Smith, 1964).

### **4.4.2 PURIFICATION DES MEAG PAR HPLC SUR COLONNE DE SILICE**

La purification permet d'isoler les MEAG d'autres types de molécules (alcools, stérols, hydrocarbures...). Cette séparation n'a été réalisée que pour les fractions lipides polaires totaux et lipides neutres totaux, les fractions contenant les différentes classes de lipides

polaires étant automatiquement épurées lors des séparations par CLHP. La séparation des MEAG a été réalisée à l'aide d'un système CLHP équipé d'un détecteur U.V. à 206nm. Les MEAG ont été purifiés au moyen de deux colonnes alignées en série : une colonne silice greffée OH (Lichrosorb Diol, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm ID, Merck) et une colonne silice classique (Lichospher Si 60, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm ID, Merck). La phase mobile binaire était composée d'un solvant A (hexane) et d'un mélange de solvants B (hexane/isopropanol, 90:10, v/v) (Marty et al., 1999). Les échantillons de MEAG de lipides polaires totaux ont été évaporés sous azote et repris par 2 fois 50  $\mu$ L d'hexane avant d'être injectés dans la boucle de 200  $\mu$ L du système CLHP. Cette séparation a été réalisée à température ambiante, à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

---

#### **4.4.3 ANALYSE DES MEAG PAR CPG**

Les méthyl-esters d'acides gras (MEAG) ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian CP 8400 équipé d'un injecteur on-colonne et d'un détecteur FID. Ils ont été séparés sur une colonne capillaire CPWAX 52 CB (25m x 0,25mm ID ; 0,2 $\mu$ m epf), programmée en température, avec de l'hydrogène comme gaz vecteur. Les pics obtenus ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards. Pour une meilleure identification, les MEAG ont été séparés parallèlement sur une colonne apolaire CP-Sil 8CB (25m x 0,25 ID ; 0,2 epf). L'analyse des MEAG sur deux colonnes permet d'identifier certains composés pouvant être co-élus. Dans le cas des extraits lipidiques marins ici étudiés, ceci s'avère nécessaire en raison de la grande diversité d'acides gras présents.

#### 4.4.4 CALCUL DE LA PROPORTION DES CLASSES ET SOUS-CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

L'aire des pics de chaque acide gras a été quantifiée à l'aide d'un étalon interne, le C23:0. Le spectre quantitatif d'acides gras ainsi obtenu en CPG permet de calculer le nombre de moles de chaque acide gras pour l'échantillon considéré. L'intégration des pics et les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Galaxie 1.9.3.2 (Varian). La plupart des résultats présentés dans ces travaux sont exprimés en pourcentage molaire, sauf si indiqué autrement.

Pour chaque classe de phospholipides, le nombre de moles d'acides gras issues de cette classe a donc été déterminé par CPG. Pour les diacylglycérophospholipides (PE, PC, PS et PI), le nombre de moles d'une classe a alors été obtenu en divisant le nombre total de moles d'acides gras de cette classe par deux, et par quatre pour le cardiolipide. Dans le cas des plasmalogènes, du CAEP et de la LysoPC, le nombre de moles de chacune des sous-classes a été directement déduit du nombre total de moles d'acides gras calculé par CPG pour la sous-classe considérée.

#### 4.5 SEPARATION DES CLASSES DE LIPIDES NEUTRES PAR CCMHP

Les différentes classes de lipides neutres ont été analysées par CCMHP sur des plaques de verre (1010 mm) imprégnées de silice. Un lavage préliminaire de la plaque a été réalisé avec un mélange hexane/diéthyl éther (1:1, v/v) afin d'enlever les possibles impuretés. La plaque a ensuite été activée à 110°C pendant 30 minutes. Les fractions de lipides neutres ont été déposées (4 µL) par un passeur automatique de type CAMAG (CAMAG). Les lipides neutres ont ensuite été séparés par une migration en deux dimensions. Lors de la première migration un mélange hexane/diéthyl éther/acide acétique (20/5/0.5, v:v:v) a été utilisé et un mélange hexane/diéthyl éther (93/3, v:v) lors de la deuxième. Les classes de lipides neutres sont révélées sous forme de taches noires après immersion dans une solution d'acide cuprique et d'acide phosphorique et chauffage à 120°C pendant 20 minutes. Sept classes de lipides neutres ont pu être séparées (acides gras libres, esters de stérols, éthers de glycérides, monoacylglycérols, diacylglycérols, triacylglycérols et stérols) et identifiées par comparaison avec des standards et des techniques de coloration. La quantification a été réalisée par densitométrie à l'aide d'un scanner réglé à 370 nm et du logiciel Wincats (CAMAG).

## 5 ANALYSES STATISTIQUES

Les tests de Shapiro-Wilks et du  $\chi^2$  ont été utilisés, respectivement, pour tester des distributions normales et uniformes. Le test du  $\chi^2$  a aussi été utilisé pour déterminer si deux échantillons ou plus avaient la même distribution. La normalité des distributions a été testée grâce au test de Shapiro-Wilks et leur homoscedasticité grâce à celui de Levene. Deux moyennes ont été comparées en utilisant un test T. Pour comparer plus de deux moyennes une ANOVA suivie *a posteriori* par le test PLSD de Fisher a été utilisée. Avant comparaison, les pourcentages ont été transformés en  $\arcsin(\sqrt{X})$ . La corrélation linéaire de Pearson a été utilisée pour tester des relations entre deux variables. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statistica (StatSoft Inc., Version 8.0). Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. Le seuil de probabilité utilisé était  $\alpha=0.05$  (sauf si indiqué différemment).







# **CHAPITRE 1 : COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE DES HEMOCYTES**



# CHAPITRE 1 : COMPOSITION LIPIDIQUE

## MEMBRANAIRE DES HEMOCYTES

### 1 INTRODUCTION

Un pré-requis essentiel pour toute étude des relations entre les structures lipidiques membranaires et les fonctions hémocytaires de bivalves marins, est la connaissance de certaines caractéristiques de leur composition lipidique membranaire détaillée « de base », qui est à ce jour inconnue. Une étude comparative de la composition lipidique membranaire détaillée d'hémocytes chez quatre espèces de bivalves fait l'objet de ce premier chapitre.

Dans le cadre de l'étude des altérations de composition lipidique associées à la néoplasie disséminée, il apparaît que seules certaines espèces semblent être affectées par cette pathologie. Il s'agit plus particulièrement des myes (*Mya arenaria*) et des coques (*Cerastoderma edule*) mais aussi certaines espèces d'huîtres (*Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis*) et des moules (*Mytilus spp.*). Au contraire, certaines espèces comme la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) ou l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) ne semblent pas (ou très peu fréquemment) touchées par cette pathologie (Elston et al., 1992; Barber, 2004). Il nous est alors apparu intéressant de comparer les compositions lipidiques membranaires détaillées « de base » d'hémocytes chez des espèces « non touchées » par la néoplasie disséminée : l'huître creuse *C. gigas* et la palourde japonaise *R. philippinarum*; et sur des espèces « touchées »: la coque *C. edule* et la mye *M. arenaria*.

Pour ce qui est des espèces non touchées par la néoplasie disséminée, la comparaison de *C. gigas* vs. *R. philippinarum* a permis d'étudier deux espèces phylogénétiquement distinctes (Ostreidé Ptériomorphe vs. Vénéroïdé Hétérodonte) et présentant des habitats et des modes de vies différents (epigé vs. endogé). L'étude des deux espèces *C. edule* et *M. arenaria* avait plus particulièrement pour objectif de comparer deux espèces connues pour

avoir des spécificités de compositions en AG particulières. En effet, Kraffe (2003) avait montré que le type d'acide gras spécifiquement associé aux plasmalogènes variait phylogénétiquement : acides gras NMI dans le cas de la coque, et 20:1n-11 dans celui de la mye.

Il s'agissait plus précisément de déterminer si, pour ces 4 espèces, les membranes des hémocytes de bivalves présentaient :

- (i) des caractéristiques communes comme :
  - des particularités lipidiques supposées comme un fort taux de plasmalogènes et une association spécifique de certains acides gras particuliers à ces plasmalogènes
  - des particularités lipidiques inattendues, spécifiques à ce type cellulaire
- (ii) des particularités lipidiques variant en fonction de l'espèce considérée, par exemple en relation avec leur sensibilité à la néoplasie disséminée et/ou leur classification phylogénétique et/ou leur habitat et mode de vie

La première partie de ce chapitre est dédiée à l'étude de la composition lipidique détaillée des membranes d'hémocytes, concernant des espèces non touchées par la néoplasie disséminée (*C. gigas* et *R. philippinarum*).

La seconde partie de ce chapitre présente les résultats obtenus pour les deux espèces pouvant être affectées par la néoplasie disséminée, *C. edule* et *M. arenaria*, et les compare avec ceux obtenus pour *C. gigas* et *R. philippinarum*.

Enfin, la troisième partie de ce chapitre insiste plus particulièrement sur la composition en acides gras des plasmalogènes dans les membranes d'hémocytes chez ces quatre espèces.

## 2 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DES MEMBRANES D'HEMOCYTES CHEZ L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* ET LA PALOURDE JAPONAISE *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

Les résultats de cette première partie devant faire l'objet d'une publication (« **Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*** »), ils sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, dont le résumé est également traduit en français ci-après.

## Résumé

La composition détaillée en phospholipides (PL) (proportions relatives des classes et sous-classes de PL et leurs compositions respectives en acides gras (AG)) des membranes d'hémocytes a été étudiée chez deux espèces de mollusques : l'huître creuse *Crassostrea gigas* et la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Chez les deux espèces, les lipides membranaires des hémocytes ont présenté une composition générale similaire, la forme diacyl+alkyl de la glycérophosphatidylcholine (PC), la forme plasmalogène de la glycérophosphatidyléthanolamine (PE) et le céramide aminoéthylphosphonate (CAEP) représentant les trois principales classes et sous-classes de PL. La teneur en CAEP est élevée (14,5% et 27,9% des PL, respectivement chez *C. gigas* et *R. philippinarum*) et il est principalement composé d'AG saturés (>90%). Les plasmalogènes ont été également trouvés en forte proportion (environ 30% des PL), avec les formes plasmalogènes de la PE et de la glycérophosphatidylsérine (PS) représentant 82-83% et 46-55% de l'ensemble de la PE et de la PS, respectivement. Comparativement aux formes diacyl+alkyl, les formes plasmalogènes de la PE et de la PS sont spécifiquement enrichies en AG « non-methylene interrupted » et en 20:1n-11, suggérant un rôle fonctionnel de ces espèces moléculaires dans les hémocytes de bivalves. La proportion de lysoglycérophosphatidylcholine (LysoPC) est également particulièrement élevée dans les hémocytes, représentant environ 8% des PL. Des caractéristiques différentes entre les espèces ont également été mises en évidence, particulièrement au niveau des compositions en AG du CAEP, de la LysoPC et de la glycérophosphatidylinositol (PI). L'observation de frottis d'hémolymphe et les analyses réalisées par cytométrie en flux ont révélé des différences morphologiques et de sous-populations d'hémocytes en fonction des espèces. Cela pourrait expliquer en partie les différences de composition lipidique entre les deux espèces.

**Membrane phospholipid composition of hemocytes in the Pacific oyster  
*Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum***

Fabienne LE GRAND<sup>1</sup>, Edouard KRAFFE<sup>1\*</sup>, Yanic MARTY<sup>1</sup>, Ludovic DONAGHY<sup>2</sup>, and  
Philippe SOUDANT<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unité Mixte CNRS 6521 - Université de Bretagne Occidentale - 29200 Brest - France

<sup>2</sup> Unité Mixte CNRS 6539 - IUEM - Université de Bretagne Occidentale - 29280  
Plouzané - France

E-mail : [Edouard.Kraffe@univ-brest.fr](mailto:Edouard.Kraffe@univ-brest.fr)

Phone number: 33.2.98.01.61.51

Fax number: 33.2.98.01.70.01

## Abstract

The detailed phospholipid (PL) composition (relative proportions of PL classes and subclasses and their respective fatty acid (FA) compositions) of hemocyte membranes were investigated in two bivalve mollusks: the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. In both species, membrane lipids of hemocytes presented a similar general composition with diacyl+alkyl forms of glycerophosphatidylcholine (PC), plasmalogen form of glycerophosphatidylethanolamine (PE) and ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) being the three main PL classes and subclasses. CAEP content was high (14.5% and 27.9% of the PL, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*) and was mainly composed of saturated FA (>90%). Plasmalogens were also found in high proportions (about 30% of the PL), with plasmalogen forms of PE and glycerophosphatidylserine (PS) representing 82-83% and 46-55% of total PE and PS, respectively. When compared to their respective diacyl+alkyl forms, plasmalogen forms of PE and PS were specifically enriched in non-methylene-interrupted FA and 20:1n-11, suggesting a functional significance of these PL molecular species in bivalve hemocytes. Lysoglycerophosphatidylcholine (LysoPC) levels were found to be particularly high in hemocytes, accounting for about 8% of the PL. Some species-specific features were also evidenced, notably in CAEP, LysoPC and glycerophosphatidylinositol (PI) FA compositions. Hemolymph cell monolayer observations and flow cytometry analyses revealed species-specific hemocyte morphology and sub-populations which could account for some of the species-specific membrane lipid compositions.



## Abbreviations

**CAEP:** ceramide aminoethylphosphonate; **CL:** cardiolipin; **LysoPC:** lysoglycerophosphatidylcholine; **FA:** fatty acids; **FSC:** forward scatter; **GPL:** glycerophospholipid; **HCM:** hemolymph cell monolayer; **MUFA:** monounsaturated fatty acid; **NMI:** non-methylene-interrupted; **HPLC:** high performance liquid chromatography; **PC:** glycerophosphatidylcholine; **PCplsm:** PC plasmalogen; **PE:** glycerophosphatidylethanolamine; **PEplsm:** PE plasmalogen; **PI:** glycerophosphatidylinositol; **PL:** phospholipid; **plsm:** plasmalogen; **PUFA:** polyunsaturated fatty acid; **PS:** glycerophosphatidylserine; **PSplsm:** PS plasmalogen; **SFA:** saturated fatty acid; **SSC:** side scatter.

## Keywords

Hemocytes; cellular immunity; *C. gigas*; *R. philippinarum*; phospholipid classes; fatty acid composition; plasmalogens; ceramide aminoethylphosphonate; non-methylene-interrupted fatty acids.

## **Introduction**

In bivalves, internal defense is mediated by cells freely circulating in hemolymph, referred as hemocytes (Cheng, 1996; Chu, 2000). These cells act as sentry cell, scanning the immediate environment to detect foreign material and induce efficient immune response. They are responsible for non-self particles recognition and elimination, through mechanisms of chemotaxis, secretion of humoral factors, encapsulation, phagocytosis and reactive oxygen species production (Cheng, 1996; Chu, 2000). Although hemocyte functions are often thought as restricted to immunity, they play major roles in multiple physiological functions such as tissue repair, shell production and repair, nutrient digestion, transport and excretion (Cheng, 1996; Chu, 2000). Hemocytes were then suggested as key role players in maintaining homeostasis in bivalves (Donaghy et al., 2009). Moreover, cellular defense-related parameters appeared as especially sensitive to variations of environmental factors, including temperature, nutrients and toxicants (Chu, 2000).

Recent nutrition studies suggested a relationship between global FA composition of membrane lipids and bivalve hemocyte functions. An increase in 20:4n-6 levels resulted in an increase of phagocytosis and reactive oxygen species production of oyster hemocytes (Delaporte et al., 2006), whereas a 20:5n-3 increase resulted in a decrease of the same parameters (Delaporte et al., 2007). These preliminary results emphasized the possible roles of the FA moiety of membrane lipid constituents in relation to hemocyte functions. In vertebrates, the concept of a relationship between membrane fatty acid (FA) composition and function of immune cells has emerged about three decades ago (Calder, 2008). However, more and more, membrane PL related functions emerge to depend not only on the global FA composition but also on specific composition of the individual membrane PL, determined by particular polar heads (choline, serine, ...), linked to particular FA, by different linkages (ester, vinyl ether, ether) (Phillips et al., 2009). Moreover, recent investigations on membrane PL class and subclass composition in marine bivalves hypothesized physiological roles of peculiar PL and their FA composition, notably plasmalogens, in these organisms (Kraffe et al., 2004; 2006).

Bivalve hemocytes represent appropriate candidates for the study of the implication of membrane PL in cell functions, particularly in relation to immunity and homeostasis. To date, the detailed characterization of the membrane PL composition of hemocytes has never been exhaustively conducted in bivalves. Such description appears as a prerequisite to further determine the possible involvement of these molecules in hemocyte functions. In the present study, PL class and subclass composition (proportions and their respective FA composition) of hemocytes was investigated in two phylogenetically distinct bivalve species with different habitat and lifestyle: the Manila clam (*Ruditapes philipinarum*) (Heterodonta, Veneroidae) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) (Fillibranchia, Ostreidae). The putative roles of some characteristic PL constituents of hemocytes are discussed in relation to hemocyte functions.

## **Material and methods**

### ***Chemicals and material***

High performance liquid chromatography (HPLC) grade solvents were purchased from VWR International. Butylated hydroxytoluene (BHT), boron trifluoride (BF<sub>3</sub>, 14% by weight in methanol) and SYBR Green I were obtained from Sigma-Aldrich. Silica gel 60 (63-230µm mesh) was purchased from Merck. RAL 555 kit was obtained from Reactifs RAL. Diol phase columns were OH-bound silica gel columns, K5OH\*25QS, 250 x 4mm i.d., from Interchim. Polar capillary column was a CPWAX 52 CB - 25 m x 0.25 mm i.d.; 0.2 µm thickness and the non-polar one was a CP-Sil 8 CB - 25 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm thickness and were obtained from Varian.

### ***Sample preparation and lipid extraction***

Adult clams (*R. philipinarum*) and oysters (*C. gigas*) were collected from the Bay of Brest (France) in December 2006 and January 2007, respectively. Hemolymph was withdrawn from adductor muscle using 25-gauge sterile hypodermic needle attached to a 1-mL plastic syringe. Hemolymph from each individual was kept on crushed ice to prevent hemocyte clotting. Hemolymph samples were then examined microscopically for contamination. Any hemolymph sample deemed of low quality was not use for lipid analysis.

Hemolymph samples of at least twenty individuals were then transferred in glass vials maintained on ice, to obtain a pool of 18 mL hemolymph. Five replicates were prepared for both species. Using Malassez's cell, hemocyte concentrations were determined on each hemolymph pool replicate. Hemolymph pools were then centrifuged at 400 *g* (15 min, 4°C) to pellet hemocytes. After centrifugation, hemolymph supernatant was removed from the vials. Hemocyte lipid extraction was conducted by resuspending pellets in 10 mL of a chloroform/methanol mixture (2:1, vol/vol). To ensure a complete lipid extraction, vials were

sonicated 10 minutes at 4°C. After adding 0.01% w/w of BHT as antioxidant, extracts were stored at -20°C under nitrogen before analysis.

#### ***Separation of polar lipids on a silica gel microcolumn***

Lipid extracts were evaporated to dryness, recovered with three washing of 0.5 mL chloroform/methanol (98:2, vol/vol) and deposited at the top of a silica gel microcolumn (40 mm x 5 mm i.d., silica gel 60 previously heated at 450°C and deactivated with 6% water by weight) (Marty et al., 1992). Neutral lipids were eluted with 10 mL of chloroform/methanol (98:2, vol/vol). Polar lipids were eluted with 20 mL of methanol. This fraction was used for PL class and subclass separation by HPLC and their FA composition analysis.

#### ***Separation of phospholipid classes***

Separation of the PL classes and subclasses was achieved according to the method previously described by Kraffe et al. (2004) using a combination of two successive HPLC separations with two different mobile phases. The first separation was achieved on a Diol phase column and allowed the collection of a first fraction containing glycerophosphatidylethanolamine (PE; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms), ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) and glycerophosphatidylcholine (PC; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms), and a second fraction containing cardiolipin (CL), glycerophosphatidylinositol (PI), glycerophosphatidylserine (PS; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms) and lysoglycerophosphatidylcholine (LysoPC). PE, PC and PS were then treated separately for separation of 1-alkenyl-2-acyl forms (plasmalogens). As previously described by Soudant et al. (1995), this method, based on the use of an acidic mobile phase, allows the hydrolysis of the vinyl ether bond at the *sn*-1 position of the glycerol backbone of the plasmalogen forms and creates lyso-analogs that elute later than the intact 1-2-diacyl and 1-alkyl-2-acyl forms. The suffixes “plsm” and “diacyl+alkyl” were used to designate respectively plasmalogen and non-plasmalogen forms of PC (PCplsm and PCdiacyl+alkyl), PE (PCplsm and PCdiacyl+alkyl) and PS (PCplsm and PCdiacyl+alkyl).

***Fatty acid analysis***

The ten PL class and subclass fractions were separated and collected. Fractions were evaporated at 40°C in a vacuum centrifuge, but were not allowed to dry completely in order to prevent the degradation of unsaturated FA in the acidic phase, in particular those at the *sn*-2 position of plasmalogens (Soudant et al., 1995). Those fractions were then transesterified during 10 minutes at 100°C after adding 800 µL of BF<sub>3</sub>, 0.01% w/w BHT as antioxidant and C23:0 as internal standard. Due to the difficulty to break the amide bond, CAEP was transesterified during 5 h at 100°C following a protocol adapted from Morrison and Smith (1964). After cooling and adding 800 µL of hexane, the organic phase, containing FA methyl-ester, was washed three times with 1.5 mL of hexane saturated water. Organic phase was recovered and analyzed in a Varian CP 8400 gas chromatograph equipped with an on-column injector and a flame ionization detector. FA methyl-esters were identified using both polar and non-polar capillary columns, by means of known standard mixtures (Soudant et al., 1995).

***Calculation of phospholipid class amounts and fatty acid compositions***

The quantities of each PL class or subclass were determined from their respective FA spectrum obtained by gas chromatography, using C23:0 internal standard. Integration and calculations were done with the software program Galaxie 1.9.3.2 (Varian). To obtain the molar content of each analyzed fraction, a calculation factor was applied to their respective total FA molar contents: x1 for plasmalogens, CAEP and LysoPC; x1/2 for PI and the diacyl+alkyl form of PE, PC and PS, and x1/4 for the CL. FA were expressed as the molar percentage of total FA content of each class or subclass. For plasmalogen subclasses, the total percentage was adjusted to 50% to take into account the absence of alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase.

***Hemolymph cell monolayers and flow cytometry analyses***

Hemolymph cell monolayers (HCM) were prepared in two different ways: spontaneous cell adhesion and cyto-centrifugation. To perform spontaneous adhesion, diluted hemolymph (1:1, v:v) in sterile seawater was set onto a Poly-L-Lysine-coated glass slide maintained in moist chamber at room temperature. For cyto-centrifugation, hemolymph was diluted (1:2, v:v in sterile seawater) in sterile seawater prior to be cyto-centrifuged at 50 *g* for 5 min. Both spontaneous adhesion HCM and cyto-centrifuged HCM were then transferred in 100% methanol prior to be stained with RAL 555 kit. Air dried stained HCM slides were subsequently mounted and microscopically observed.

Hemocyte sub-populations were determined by flow cytometry using SYBR Green I, a freely membrane permeant fluorescent dye that binds to double-stranded DNA. Diluted hemolymph (1:3, v:v in sterile seawater) was mixed with SYBR Green I solution (final dilution 10x) and incubated 120 minutes in the dark, at room temperature before flow cytometry analysis (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Hemocyte sub-populations were discriminated based upon relative morphological parameters, forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). FSC and SSC commonly estimate particle size and internal complexity, respectively. Internal complexity, also reported as granularity, depends upon various inner components of the cells including shape of the nucleus, amount and types of cytoplasmic granules, cytoplasmic inclusions and membrane roughness. Morphological parameters are expressed in arbitrary flow-cytometric units. Flow cytometric data were analyzed using the software WinMDI 2.8.

## Results

### Phospholipid quantities

PL quantities were  $10.9 \text{ nmole} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $7.5 \text{ nmole} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  in *C. gigas* and *R. philippinarum* hemocytes, respectively (Table 5).

Table 5 : Phospholipid (PL) quantities and composition in hemocytes from *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*.

	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>
PL quantity	$10.9 \pm 1.7$	$7.5 \pm 0.7$
Phospholipid composition		
PCdiacyl+alkyl	$33.7 \pm 4.3$	$25.4 \pm 4.6$
PCplsm	$1.6 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.4$
PEdiacyl+alkyl	$5.6 \pm 1.1$	$4.0 \pm 1.0$
PEplsm	$26.9 \pm 1.4$	$20.2 \pm 2.9$
PSdiacyl+alkyl	$2.3 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.7$
PSplsm	$3.5 \pm 2.1$	$4.1 \pm 0.8$
PI	$2.7 \pm 0.5$	$3.3 \pm 1.4$
CL	$1.0 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.3$
CAEP	$14.5 \pm 1.7$	$27.9 \pm 4.8$
LysoPC	$8.3 \pm 2.4$	$7.6 \pm 3.7$
Plasmalogen proportion		
Total plasmalogen (/PL) <sup>a</sup>	$31.9 \pm 3.4$	$27.0 \pm 3.7$
Total plasmalogen (/GPL) <sup>b</sup>	$37.2 \pm 3.5$	$38.1 \pm 5.6$
PCplsm (/PC) <sup>c</sup>	$5.0 \pm 1.4$	$11.1 \pm 2.9$
PEplsm (/PE)	$83.0 \pm 3.0$	$82.1 \pm 5.2$
PSplsm (/PS)	$46.5 \pm 10.3$	$55.4 \pm 4.8$

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=5) in nmol PL. $10^{-6}$  cells for PL quantity and in mol% of total PL for PL composition and plasmalogen proportions.

<sup>a</sup> % of the plasmalogen forms to total phospholipids (including CAEP)

<sup>b</sup> % of the plasmalogen forms to the total glycerophospholipids (excluding CAEP)

<sup>c</sup> % of the plasmalogen form in each class composed of the diacyl + alkyl + plasmalogen forms.



**Phospholipid classes and subclasses**

PCdiacyl+alkyl, PEplsm and CAEP were the three major classes and subclasses of hemocyte membrane lipids and accounted together for about 75% of total PL (Table 5). In *C. gigas*, PCdiacyl+alkyl was the most important (33.7%), followed by PEplsm (26.9%) and CAEP (14.5%) whereas, in *R. philippinarum*, CAEP accounted for 27.9%, followed by PCdiacyl+alkyl (25.4%) and PEplsm (20.2%). LysoPC proportion reached about 8% of total PL in both species. The other classes and subclasses, PEdiacyl+alkyl, PSdiacyl+alkyl, PCplsm, PSplsm, PI and CL, ranged from 1.0% to 5.6% of total PL.

Total plasmalogen forms of PL (PCplsm+PEplsm+PSplsm) were found in important proportions in hemocytes and reached 31.9% and 27% of total PL, and 37.2% and 38.1% of total glycerophospholipids (GPL), in *C. gigas* and *R. philippinarum*, respectively. PEplsm accounted for more than 80% of PE in both species. PS plasmalogen and diacyl+alkyl forms were found in similar proportions, with PSplsm accounting for 46.5% of the total PS in *C. gigas* and 55.4% in *R. philippinarum*. PCplsm constituted only 5.0% of PC in *C. gigas* and 11.1% in *R. philippinarum*.

**Fatty acid composition of CL, PI, CAEP and LysoPC**

CL was composed over 75% of only four FA: 22:6n-3, 20:5n-3, 16:0 and 18:0, with saturated FA (SFA) accounting for less than 30% of total FA (Table 6). In *C. gigas*, polyunsaturated FA (PUFA) were almost exclusively composed of 22:6n-3 while in *R. philippinarum*, CL contained both 22:6n-3 and 20:5n-3 in equivalent proportions.

PUFA represented about 50% of total FA of PI (Table 6). Main ones were 20:4n-6 and 20:5n-3. The proportions of 20:4n-6 and 20:5n-3 varied according to species: 14.0% vs. 17.5% for 20:4n-6 and 21.6% vs. 8.6% for 20:5n-3, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*. 22:6n-3 accounted for about 10% of total FA in both species. In *C. gigas*, level of 20:1n-7 was higher than in *R. philippinarum* (21.2% vs. 2.3%), with a concomitant lower proportion of 18:0 (8.4% vs. 22.6%).

For both species, CAEP was mainly composed of 16:0 (69.8% and 69.7% of total FA, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*) (Table 6). Proportions of the two other main SFA, 17:0 and 18:0, were higher in *C. gigas* (7.3% and 8.9%) than in *R. philippinarum* (3.5% and 4.5%). Proportions of branched FA (mainly iso17:0 and ante17:0) were found to be the especially high in CAEP as compared to other PL classes. Their proportions were higher in *R. philippinarum* (16.8%) than in *C. gigas* (5.2%).

LysoPC was mainly constituted of SFA, 61.2% and 72.1%, in *C. gigas* and *R. philippinarum* respectively (Table 6). Monounsaturated FA (MUFA) accounted for 16.8% and 23.3% of total FA in *C. gigas* and *R. philippinarum*, respectively. The main MUFA were 16:1n-7 and 18:1n-9 (4.6% and 10.4% for 16:1n-7; 5.2% and 12.6% for 18:1n-9, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*). PUFA accounted for 22.0% of total FA in *C. gigas* and were predominated by 20:5n-3 and 22:6n-3. PUFA reached only 4.6% in *R. philippinarum*.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 6: Fatty acid (FA) composition of CL, PI, CAEP and LysoPC in hemocytes from *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*.

FA	CL		PI		CAEP		LysoPC	
	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>
Branched <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2	5.2 ± 0.8	16.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
14:0	1.7 ± 0.6	1.9 ± 0.5	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.7	0.5 ± 0.1	4.4 ± 0.4	9.7 ± 1.7
15:0	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.0	3.6 ± 1.1	5.2 ± 0.9
16:0	12.2 ± 2.2	10.2 ± 1.0	10.2 ± 2.1	15.7 ± 1.2	69.8 ± 2.3	69.7 ± 0.4	35.2 ± 2.7	39.8 ± 1.9
17:0	2.2 ± 0.8	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	7.3 ± 0.8	3.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3
18:0	13.2 ± 2.5	6.8 ± 0.9	8.4 ± 1.8	22.6 ± 1.8	8.9 ± 1.9	4.5 ± 0.3	16.9 ± 2.3	15.4 ± 3.2
16:1n-7	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.8	0.2 ± 0.2	1.9 ± 0.6	1.3 ± 0.7	0.6 ± 0.2	4.6 ± 1.2	10.4 ± 1.3
18:1n-9	1.3 ± 0.5	3.0 ± 1.1	1.7 ± 0.3	2.7 ± 0.6	1.7 ± 0.4	0.8 ± 0.2	5.2 ± 1.0	12.6 ± 1.1
18:1n-7	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0
20:1n-11	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.5	0.2 ± 0.2
20:1n-9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.3	4.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0
20:1n-7	1.9 ± 0.4	0.5 ± 0.2	21.2 ± 1.7	2.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.8	0.1 ± 0.1
18:2n-6	0.0 ± 0.0	3.4 ± 2.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.3	1.3 ± 0.2
20:xNMI <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20:4n-6	1.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	14.0 ± 0.9	17.5 ± 1.5	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1
20:5n-3	3.7 ± 0.4	28.1 ± 2.3	21.6 ± 1.5	8.6 ± 0.8	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.0	8.5 ± 1.1	0.4 ± 0.2
22:2NMI(7,13)	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	1.2 ± 1.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
22:2NMI(7,15)	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.4 ± 1.4	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.2 ± 1.1	0.4 ± 0.2
22:3NMI(7,13,16)	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
22:4n-6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
22:5n-6	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.5
22:5n-3	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
22:6n-3	60.7 ± 2.0	33.4 ± 3.2	10.3 ± 2.9	10.8 ± 1.1	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.8	5.9 ± 1.2	1.0 ± 0.2
Others <sup>c</sup>	0.2 ± 0.2	3.3 ± 2.3	1.0 ± 0.2	4.0 ± 1.5	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.6	1.4 ± 0.5
Total NMI	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	4.2 ± 3.0	1.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	3.6 ± 1.3	0.8 ± 0.3
Total SFA	29.9 ± 1.4	22.3 ± 2.9	19.9 ± 3.7	43.9 ± 2.1	93.9 ± 1.5	96.3 ± 0.8	61.2 ± 2.9	72.1 ± 2.5
Total MUFA	3.6 ± 0.4	5.9 ± 2.3	28.2 ± 2.2	13.2 ± 1.1	3.2 ± 1.0	1.5 ± 0.4	16.8 ± 2.5	23.3 ± 1.7
Total PUFA	66.4 ± 1.6	71.8 ± 3.7	52.0 ± 3.1	42.9 ± 1.7	2.9 ± 0.7	2.2 ± 1.0	22.0 ± 3.2	4.6 ± 0.9
Unsat. Index <sup>d</sup>	395 ± 10	389 ± 23	269 ± 15	211 ± 10	13 ± 3	10 ± 5	116 ± 13	40 ± 5

Results are expressed as mean ± standard error (n=5) in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. <sup>d</sup> Unsaturation index was calculated as the sum of the percentage of each unsaturated FA multiplied by the number of double bonds within that FA.

***Fatty acid composition of diacyl+alkyl subclasses (PC, PE and PS)***

Among diacyl+alkyl fractions of PE, PS and PC, the highest SFA proportion was observed in PSdiacyl+alkyl (53.5% and 48.8%, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*) and the lowest in PCdiacyl+alkyl (32.3% and 34.8%, respectively in *C. gigas* and *R. philippinarum*) (Table 7). The distribution of 16:0 and 18:0 varied according to PLdiacyl+alkyl subclasses: 16:0 predominated in PCdiacyl+alkyl and 18:0 predominated in PEdiacyl+alkyl for both species. PSdiacyl+alkyl of *R. philippinarum* was predominated by 18:0 while 16:0 and 18:0 were found in similar proportions in *C. gigas* PSdiacyl+alkyl.

MUFA proportion ranged from 11.2% to 21.0% in *C. gigas* and from 9.2% to 12.6% in *R. philippinarum*. In all diacyl+alkyl fractions, 20:1n-7 and 18:1n-7 were found in higher proportions in *C. gigas* when compared to *R. philippinarum*.

PUFA proportions ranged from 35.3% of total FA (in *C. gigas* PSdiacyl+alkyl) to 52.5% (in *R. philippinarum* PCdiacyl+alkyl), with 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 accounting together for 28.0% to 41.3% of total FA. However, relative proportions of 20:5n-3 and 22:6n-3 differed according to species. In all diacyl+alkyl subclasses, proportion of 22:6n-3 in *R. philippinarum* was more than two times higher than 20:5n-3 proportion whereas the opposite was observed in *C. gigas* (1.8 to 4 times lower). In PEdiacyl+alkyl and PSdiacyl+alkyl, non-methylene-interrupted (NMI) FA were also found in relative high proportions, accounting for 5.1% to 6.6% of total FA.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 7: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS in hemocytes from *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*.

FA	PCdiacyl+alkyl		PEdiacyl+alkyl		PSdiacyl fraction	
	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>
Branched <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
14:0	1.9 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	2.8 ± 1.0	1.3 ± 0.2
15:0	2.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.7	0.6 ± 0.2
16:0	22.5 ± 0.3	20.5 ± 0.7	9.9 ± 1.3	9.6 ± 0.4	26.5 ± 6.4	13.1 ± 3.4
17:0	1.3 ± 0.0	1.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2	2.4 ± 0.2	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.3
18:0	2.9 ± 0.2	9.3 ± 0.6	19.5 ± 1.5	30.8 ± 1.2	21.1 ± 4.6	31.2 ± 2.0
16:1n-7	2.2 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.7 ± 0.4	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.5	1.6 ± 0.6
18:1n-9	3.7 ± 0.2	4.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3	3.2 ± 0.5	3.0 ± 0.6	3.6 ± 0.5
18:1n-7	8.8 ± 0.3	3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.7	0.8 ± 0.3
20:1n-11	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	2.0 ± 0.3
20:1n-9	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.4 ± 0.1
20:1n-7	4.1 ± 0.3	0.5 ± 0.0	7.4 ± 0.5	1.5 ± 0.3	4.4 ± 0.8	0.5 ± 0.3
18:2n-6	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
20:xNMI <sup>b</sup>	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
20:4n-6	4.8 ± 0.1	5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.3	7.6 ± 0.3	4.0 ± 0.5	6.1 ± 0.6
20:5n-3	22.4 ± 0.7	10.8 ± 0.3	28.1 ± 0.5	7.2 ± 0.8	18.4 ± 2.1	8.0 ± 0.9
22:2NMI(7,13)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.2
22:2NMI(7,15)	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	4.1 ± 0.9	3.2 ± 0.5	5.9 ± 1.5	3.5 ± 0.8
22:3NMI(7,13,16)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
22:4n-6	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2
22:5n-6	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1
22:5n-3	0.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2
22:6n-3	12.1 ± 0.4	24.1 ± 0.5	7.0 ± 0.2	16.7 ± 0.3	5.6 ± 1.6	18.8 ± 1.4
Others <sup>c</sup>	4.4 ± 0.5	4.9 ± 0.2	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.4
Total NMI	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.3	5.1 ± 1.0	5.5 ± 0.7	6.6 ± 1.8	5.3 ± 1.0
Total SFA	32.3 ± 0.6	34.8 ± 0.7	36.1 ± 1.3	45.5 ± 1.9	53.5 ± 3.7	48.8 ± 2.0
Total MUFA	21.0 ± 0.4	12.6 ± 0.4	14.7 ± 0.8	11.7 ± 0.9	11.2 ± 1.2	9.2 ± 1.1
Total PUFA	46.7 ± 0.4	52.5 ± 0.7	49.2 ± 1.0	42.8 ± 1.1	35.3 ± 2.9	42.1 ± 2.6
Unsat. Index <sup>d</sup>	245 ± 3	275 ± 4	241 ± 3	211 ± 5	168 ± 13	215 ± 12

Results are expressed as mean ± standard error (n=5) in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. <sup>d</sup> Unsaturation index was calculated as the sum of the percentage of each unsaturated FA multiplied by the number of double bonds within that FA.

***Sn-2 fatty acid composition of plasmalogen subclasses (PCplsm, PEplsm and PSplsm)***

The SFA content was found to be very low in PEplsm (<4.0%) and in higher proportions in PSplsm and PCplsm (13.1% to 23.8%) (Table 8).

MUFA were low (less than 11%) and were mainly constituted of 16:1n-7 and 18:1n-9 for PCplsm. Differently, 20:1n-11 was the main MUFA in PEplsm and PS plsm, reaching respectively 17.1% and 48.2% of total MUFA in *C. gigas* and 70.3% and 70.0% in *R. philippinarum*. A specific 20:1n-11 enrichment of aminoplasmalogen subclasses was observed, particularly in PSplsm where 20:1n-11 proportion was 3.8 and 13.7 times higher than in PSdiacyl+alkyl, in *R. philippinarum* and *C. gigas*, respectively.

PUFA were found in equal proportions within subclasses between both species. In plasmalogens, 20:5n-3 was always in higher proportion in *C. gigas* than in *R. philippinarum*, whereas it was the opposite for NMI. Total NMI FA in PEplsm and PSplsm accounted respectively for 17.1% and 45.2% of total PUFA in *C. gigas* and for 48.2% and 66.9% in *R. philippinarum*. NMI FA proportions were higher in aminoplasmalogens than in their respective diacyl+alkyl fractions, in *C. gigas* (1.4 and 1.3 times higher, respectively in PEplsm and PSplsm), and even more in *R. philippinarum* (3.4 and 8.8 times higher, respectively in PEplsm and PSplsm), indicating a specific enrichment of aminoplasmalogen subclasses by NMI FA.

In PEplsm and PSplsm of both species, the three main NMI FA were 22:2NMI(7,13), 22:2NMI(7,15) and 22:3NMI(7,13,16), with 22:2NMI(7,15) as predominant one. However, the distribution within C22 NMI FA varied according to species. C22NMI FA were largely predominated by 22:2NMI(7,15) in *C. gigas* (over 76% of total C22 NMI FA) but in a lesser extent in *R. philippinarum* (less than 62% of total C22 NMI FA).

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 8: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS in hemocytes from *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*.

FA	PCplsm		PEplsm		PSplsm	
	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>
Branched <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
14:0	1.9 ± 0.7	1.2 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.1	2.1 ± 0.7	0.9 ± 0.2
15:0	0.8 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.5 ± 0.1
16:0	14.8 ± 3.3	8.1 ± 2.2	2.2 ± 0.9	0.8 ± 0.2	13.6 ± 2.3	7.1 ± 1.4
17:0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
18:0	6.1 ± 1.4	9.6 ± 2.3	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	6.8 ± 1.9	3.9 ± 0.9
16:1n-7	1.6 ± 0.6	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.6	0.1 ± 0.0	1.8 ± 0.7	0.9 ± 0.3
18:1n-9	2.0 ± 0.6	3.6 ± 0.8	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.1	3.1 ± 1.3	1.7 ± 0.5
18:1n-7	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20:1n-11	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.1 ± 1.5	7.5 ± 0.6
20:1n-9	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.0
20:1n-7	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
18:2n-6	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
20:xNMI <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
20:4n-6	1.8 ± 0.3	3.0 ± 0.7	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1
20:5n-3	7.6 ± 1.6	3.9 ± 0.7	11.4 ± 0.8	3.0 ± 0.5	3.9 ± 1.3	0.9 ± 0.2
22:2NMI(7,13)	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1	5.3 ± 0.4	0.9 ± 0.5	5.8 ± 0.5
22:2NMI(7,15)	1.5 ± 0.4	2.0 ± 0.7	5.4 ± 0.6	9.3 ± 0.6	7.4 ± 2.7	10.7 ± 1.2
22:3NMI(7,13,16)	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.0	3.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2
22:4n-6	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.3	1.5 ± 0.1	2.4 ± 0.0	0.3 ± 0.2	1.0 ± 0.3
22:5n-6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1
22:5n-3	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2
22:6n-3	10.8 ± 3.4	13.0 ± 3.3	18.5 ± 1.3	10.3 ± 0.6	3.7 ± 0.9	4.7 ± 1.0
Others <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.5
Total NMI	1.5 ± 0.4	2.8 ± 1.0	7.4 ± 0.8	18.9 ± 1.0	8.3 ± 3.2	17.6 ± 1.7
Total SFA	23.6 ± 5.4	19.2 ± 4.5	3.7 ± 1.5	1.8 ± 0.6	23.8 ± 4.4	13.1 ± 2.8
Total MUFA	4.6 ± 1.2	5.7 ± 1.4	3.0 ± 0.8	6.4 ± 0.5	9.1 ± 1.6	10.7 ± 0.5
Total PUFA	21.9 ± 5.0	25.0 ± 5.6	43.2 ± 2.3	41.8 ± 0.7	17.2 ± 4.2	26.3 ± 3.1
Unsat. Index <sup>d</sup>	236 ± 55	262 ± 57	424 ± 20	331 ± 11	144 ± 28	187 ± 24

Results are expressed as mean ± standard error (n=5) in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. <sup>d</sup> Unsaturation index was calculated as the sum of the percentage of each unsaturated FA multiplied by the number of double bonds within that FA. The total percentage of *sn*-2 FA was adjusted to 50% to take into account the alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase as described in the Material and Methods section. Unsaturation index was calculated by only taking into account *sn*-2 fatty acyl chains.

***Hemolymph cell monolayers and flow cytometry analyses***

FSC vs. SSC density plots resulting from flow cytometry analyses of *C. gigas* and *R. philippinarum* hemocytes differed according to species (Figure 40, A and B). Based upon FSC and SSC characteristics, *C. gigas* hemocytes presented two widely spread and distant subpopulations, the granulocytes and the hyalinocytes. Differently, FSC and SSC of *R. philippinarum* hemocyte sub-populations were closer to each other and more compacted. Although two hemocyte subpopulations seemed to exist in *R. philippinarum*, they were more difficult to distinguish than those of *C. gigas*.

Comparison of HCM realized by cytocentrifugation did not allowed to evidence clear differences between species, although hemocytes seemed to be larger in *R. philippinarum* than in *C. gigas* (Figure 40, C and D). However, hemocyte spontaneous adhesion differed according to species (Figure 40, E and F). Based on this observation technique, *C. gigas* hemocytes formed high number of long and thin cytoplasmic extensions whereas *R. philippinarum* hemocytes presented a more amoeboid-like shape.



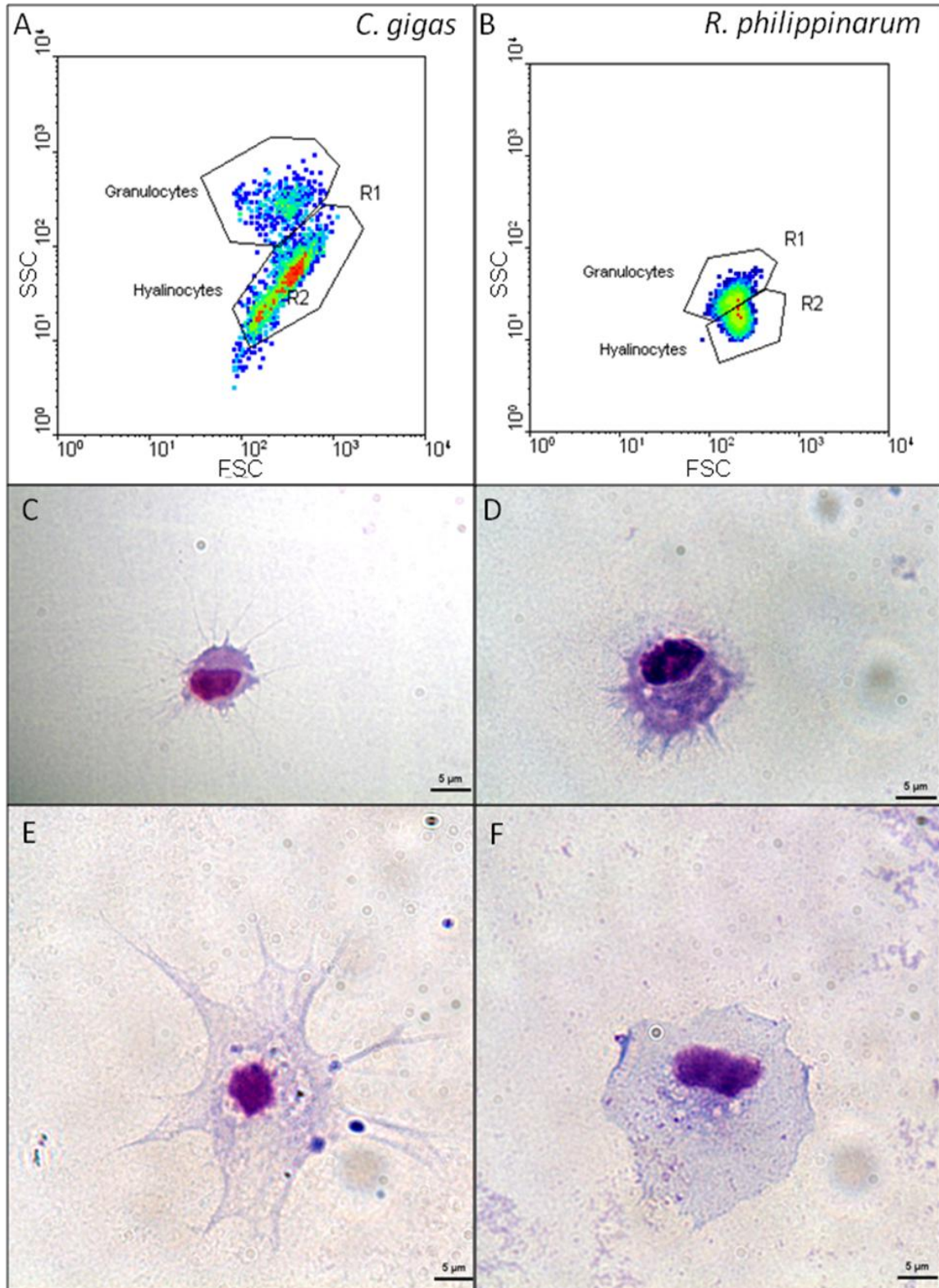


Figure 40: Characteristics of *Crassostrea gigas* (A, C, E) and *Ruditapes philippinarum* (B, D, F) hemocytes. A, B: Density plots obtained by flow cytometry, representing forward scatter (FCS, size) and side scatter (SSC, internal complexity) values of hemocytes of both species, and allowing distinguishing different cell sub-populations. C, D; E, F: Light-microscopy photos of hemocytes from hemolymph cell monolayers prepared by cyto-centrifugation (C and D) and by spontaneous cell adhesion (E and F). Coloration RAL 555 kit. Magnification x 100.

## Discussion

Phospholipid (PL) of hemocytes from the Pacific oyster *C. gigas* and the Manila clam *R. philippinarum* described by their class and subclass proportions and FA compositions presented similar general patterns. PCdiacyl+alkyl, PEplsm and CAEP were the three main PL classes and subclasses. In both species, CAEP, LysoPC, PI and plasmalogens presented high proportions and/or specific FA composition.

CAEP is a phosphosphingolipid, constituted by an ethanolamine head group linked to a ceramide via a phosphono group (O-P-C), different from commonly encountered sphingomyelin, which is constituted by a choline polar head linked to a ceramide via a phosphate group (O-P-O). CAEP is widely distributed among many marine species, including mollusks (Joseph, 1982; Kostetsky and Velansky, 2009) and is thought to replace sphingomyelin in invertebrates (Vaskovsky, 1989). Indeed, additionally to their common sphingolipid structure, CAEP and sphingomyelin both present a highly saturated FA composition (Joseph, 1982; Ramstedt et al., 1999). The highest CAEP cell content observed to date in bivalves was reported in *Scapharca broughtoni* erythrocytes (20.2%) (Chelomin and Zhukova, 1981). High CAEP contents were also evidenced in *Crenomytilus grayanus* gills and muscles (16.8%) (Kostetsky and Velansky, 2009). Thus, high content of CAEP in bivalve hemocytes (14.5% in *C. gigas* and 27.9% in *R. philippinarum*) raises some questions on its potential implication in hemocyte functions, possibly analogue to those reported for sphingomyelin in vertebrates.

Lipid rafts in mammals were revealed to contain high amounts of sphingolipid (Lindner and Naim, 2009). Similarly, high CAEP proportion in hemocytes may also be associated to formation of lipid rafts. These membrane sub-compartmentalizations that segregate proteic and lipidic constituents such as sphingolipids play important roles in various mechanisms such as endocytosis, immune cell signaling or virus budding (Laude and Prior, 2004). CAEP, as a phosphonolipid, could also play a role in membrane stabilization, protecting membrane lipids from hydrolytic enzymes, such as phospholipases and

phosphatases (Mukhamedova and Glushenkova, 2000). This is in agreement with the observation of a high proportion of CAEP (39%) in the plasma membrane of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (Aley et al., 1980) which was suggested to significantly contribute to the self-protection of this parasite against its own secreted hydrolytic proteins (Andrä et al., 2004). Hydrolytic enzymes are also contained in high amount in hemocyte phagolysosomes (López et al., 1997). Our hypothesis is that CAEP could also be preferentially localized in phagolysosomes of bivalve hemocytes. Considering the putative functional analogy between sphingomyelin and CAEP, this hypothetical preferential localization would be supported by the study of Mason et al. (1972) who evidenced higher sphingomyelin levels in phagocytic vesicles than in whole cell membranes of mammal macrophages.

Mason et al. (1972) also observed a higher proportion of SFA in phagocytic vesicles than in whole cells. These authors suggested that because they are not susceptible to peroxidation, the saturated FA could be important in stabilization of the phagocytic vesicle structure. In the present study, high CAEP content and its enrichment with SFA could have analog protecting roles on membrane lipids of phagocytic vesicle. Among SFA, branched FA were found in higher proportion in CAEP than in other PL classes, for both species (16.8% of the total SFA in *R. philippinarum* and 5.2% in *C. gigas*). CAEP from *M. edulis* was also reported to contain high proportion of branched FA (12%) (Joseph, 1982). Although the role of branched FA is not fully understood, they were suggested to increase the fluidity of membrane lipids, as an alternative to double bonds, which are more liable to oxidation (Kaneda, 1991).

As CAEP, LysoPC content was found to be high in hemocyte membranes, reaching about 8% of total PL of both species. This is higher than the 3-5% range of LysoPC concentrations previously described in different bivalve species and in different organs (Kraffe et al., 2004; 2006; Kostetsky and Velansky, 2009). As LysoPC is commonly known to be the result of phospholipase A<sub>2</sub> action on PCdiacyl (liberating *sn*-2 FA and LysoPC), high content of LysoPC may reflect presence of high amount of phospholipases in hemocytes and/or high turn-over of their membrane lipids. This would be coherent with high concentration of lysosomal enzymes, which include phospholipase, present in hemocytes

(López et al., 1997). Furthermore, in mammals, it has been demonstrated that LysoPL play key role in immunity mediation (Lin and Boyce, 2006) and in chemotaxis in the particular case of LysoPC (Quinn et al., 1988). Chemotaxis is involved in bivalve hemocyte functions, particularly in the first stages of phagocytosis, but also in nutrition and tissue and shell repair (Donaghy et al., 2009). Then, the relatively high LysoPC content observed in bivalve hemocytes could also be linked to such specific functions of hemocytes.

The most commonly encountered molecular species of PI across animal kingdom is 18:0-20:4n-6 (Wood and Harlow, 1969; Holub et al., 1970), suggesting a common cellular role. In PI, 20:4n-6 is a precursor of eicosanoids, that have an essential role in modulation of immune functions (Tilley et al., 2001) and particularly of leukotrienes which are mainly synthesized by leukocytes (Funk, 2001). In the present study, 18:0 and 20:4n-6 were the main FA found in *R. philippinarum* hemocytes, whereas 20:1n-7 and 20:5n-3 seemed to partially replace 18:0 and 20:4n-6, respectively in *C. gigas*. Such species-specific marked differences in PI FA composition could reflect PI-related mechanisms differing between species.

Hemocyte plasmalogen content was high in both species ( $\geq 27\%$  of the PL and  $> 37\%$  of the GPL). Marine invertebrates contain high levels of plasmalogens (Joseph, 1982; Chapelle, 1987; Vaskovsky, 1989; Kraffe et al., 2004; Hanuš et al., 2009), higher than those commonly reported in vertebrates (Nagan and Zoeller, 2001). In hemocytes of both species, plasmalogen forms were found to be especially high in PE ( $> 82\%$ ) and PS ( $> 46\%$ ), but low in PC ( $< 12\%$ ). These plasmalogen levels were similar to the highest ones reported in gills of bivalves (Chapelle, 1987; Kraffe et al., 2004). In humans, one of the highest level of plasmalogens in PE (76%) was also reported in plasma membrane of human immune cells (MacDonald and Sprecher, 1989). The high plasmalogen content observed in hemocytes could thus be a characteristic of defense-related cells, for both vertebrates and invertebrates. The non lamellar conformation of PEplsm was proposed to increase membrane fluidity and to ease mechanisms such as membrane fusion (Glaser and Gross, 1994). The high levels of plasmalogens encountered in bivalve hemocytes might then reflect

the importance of mechanisms implicating membrane fusion and/or deformation, such as adhesion, aggregation, diapedesis or phagocytosis, in hemocyte behavior.

Plasmalogens were also suggested to be metabolized in order to maintain cell integrity in response to different abiotic stresses such as temperature, pH and salinity (Paltauf, 1983b; Chapelle, 1987). For example, in fishes, plasmalogen levels were found to increase with temperature (Roots and Johnston, 1968). High resistance of plasmalogens to viruses, toxins and chemical and enzymatic hydrolysis was also proposed (Chelomin and Zhukova, 1981; Paltauf, 1983b). When considering hemocyte roles on the elimination of non-self particles, high resistance capacities of hemocytes are particularly essential to ensure efficient cellular defense mechanisms in bivalves. Another plasmalogen potential role would be to protect cell component against oxidation by reactive oxygen species (Leray et al., 2002). Oxidative threat can drastically increase in hemocytes when submitted to environmental changes such as temperature increase and hypoxia (Soudant, pers. com.), or during elimination of non-self particules (Cheng, 1996; Chu, 2000; Donaghy et al., 2009).

A specific enrichment of aminoplasmalogens (PEplsm and PSplsm) with NMI FA and 20:1n-11 was especially marked in hemocytes, as compared to those of other bivalve tissues (Kraffe et al., 2004). Similarly to plasmalogens, although their biological roles are still unclear, NMI FA were proposed to confer resistance in tissue most often exposed to attack by microbial lipases (Paradis and Ackman, 1977), or to environmental variations such as temperature (Pirini et al., 2007) and to be resistant to oxidation (Barnathan, 2009). Related functions of such specific association of NMI FA and 20:1n-11 with plasmalogens remain speculative but likely reflects specific functional and structural roles of these PL molecular species.

Although high CAEP, LysoPC and plasmalogen contents, and specific association of peculiar FA within PL classes and subclasses were observed in hemocytes from both *C. gigas* and *R. philippinarum*, some differences deserve to be reported. *E.g.* hemocytes of *R. philippinarum* contained (i) more CAEP with higher branched FA content, (ii) lower PUFA proportion in LysoPC and (iii) higher NMI PUFA proportion in aminoplasmalogens than those

of *C. gigas*. Finally, in *C. gigas*, 20:1n-7 and 20:5n-3 seemed to partially replace 18:0 and 20:4n-6 in PI, respectively.

These species are indeed phylogenetically distinct. *C. gigas*, an Ostreidae, belongs to Filibranchia, whereas *R. philippinarum*, a Veneroidea, belongs to Heterodonta. Habitat and lifestyle also differ between these two species: epifaunal vs. endofaunal. As a consequence, they do not have to cope with the same biotic and abiotic factors.

Such intrinsic and extrinsic differences might have profound impact on hemocyte functioning and structure. This is for instance illustrated by flow cytometry analyses of hemocytes from both species, which depicted species-specific patterns of hemocyte sub-population morphology. Hemolymph microscopic observations also evidenced different spreading patterns between *R. philippinarum* and *C. gigas* hemocytes. These morpho-functionnal differences between both species might be related with dissimilar membrane lipid composition and fluidity. Discriminating the respective influence of intrinsic and extrinsic factors is not yet possible at this stage of the study, but these factors should clearly impact the phospholipid structures and functions of hemocytes.

## **Conclusion**

The present study brought the first available descriptive information on detailed PL composition of bivalve hemocytes. The observed common patterns and differences gave new insights on the possible functional importance of some particular PL and their specific FA composition. The present study represents an additional argument regarding the importance of considering concomitantly PL classes and subclasses proportions and their respective FA composition to further understand the roles of the complex network of membrane PL. Considering the importance of lipid components in hemocyte functions, we propose that they could provide in the future an interesting model to understand the effect of biotic and abiotic factors on lipid metabolism in bivalves.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a grant from Région Bretagne to Fabienne Le Grand. Authors thank Nelly Le Goïc for flow cytometry and optical microscopy technical support.





### **3 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DES MEMBRANES D'HEMOCYTES CHEZ DEUX POPULATIONS AFFECTEES PAR LA NEOPLASIE DISSEMINEE : LA COQUE *CERASTODERMA EDULE* ET LA MYE *MYA ARENARIA***

Les proportions relatives des classes et sous-classes de phospholipides (PL) et leurs compositions respective en acides gras (AG) ont été étudiées dans les hémocytes de deux espèces de bivalves : la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria*. Bien que ces deux espèces aient été reportées comme pouvant être potentiellement atteintes de néoplasie disséminée (Elston et al., 1992; Barber, 2004), seuls les individus sains ont été analysés dans cette étude. Les résultats concernant *C. edule* sont également intégrés dans la première partie du chapitre 3, qui rapporte les modifications lipidiques et fonctionnelles des hémocytes de coques atteintes de néoplasie disséminée. Une publication de ces résultats étant en préparation, ils sont présentés ici en anglais.

## 3.1 RESULTS

### 3.1.1 PHOSPHOLIPID QUANTITIES

Phospholipid (PL) quantities per cell were 5.1 and 6.8 nmole.10<sup>-6</sup> cells, respectively in *C. edule* and *M. arenaria* hemocytes (Table 9).

### 3.1.2 PHOSPHOLIPID CLASSES AND SUBCLASSES

PCdiacyl+alkyl, PEplsm and CAEP were the three major classes and subclasses of hemocyte membrane lipids (Table 9). PEplsm was the most important PL subclass in both species (36.6% in *C. edule* and 22.8% in *M. arenaria*), followed by PCdiacyl+alkyl (27.3%) and CAEP (12.9%) in *C. edule* whereas, in *M. arenaria*, CAEP and PCdiacyl + alkyl proportions were equivalent (≈20.0%). PSplsm and LysoPC reached high levels in *M. arenaria* (9.2% and 5.1%, respectively) whereas these PL classes accounted for only 3.5% and 1.3%, respectively in *C. edule*. The other classes and subclasses, PEdiacyl+alkyl, PSdiacyl+alkyl, PCplsm, PI and CL, ranged from 1.9% to 6.4% of total PL.

Plasmalogen forms of PL (PCplsm+PEplsm+PSplsm) were found in important proportions in hemocytes and reached 44.2% and 35.3% of total PL, and 50.7% and 45.0% of total glycerophospholipids (GPL), in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively (Table 9). Plasmalogen form of PE accounted for 87.9% and 80.0% of PE in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively. PS plasmalogen and diacyl+alkyl forms were found in similar proportions, with PSplsm accounting for 50.2% and 58.8% of the PS in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively. PCplsm constituted only 14.1% of PC in *C. edule* and 13.4% in *M. arenaria*.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 9: Phospholipid (PL) quantities and composition in hemocytes from *C. edule* and *Mya arenaria*.

	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>
PL quantity	5.1 ± 0.3	6.8 ± 1.6
Phospholipid composition		
PCdiacyl+alkyl	27.3 ± 4.4	20.0 ± 2.1
PCplsm	4.1 ± 1.2	3.2 ± 0.8
PEdiacyl+alkyl	4.9 ± 1.0	5.3 ± 0.3
PEplsm	36.6 ± 3.9	22.8 ± 2.5
PSdiacyl+alkyl	3.7 ± 1.0	6.4 ± 1.0
PSplsm	3.5 ± 0.5	9.2 ± 1.7
PI	2.7 ± 0.1	5.0 ± 0.9
CL	3.0 ± 1.2	1.9 ± 0.6
CAEP	12.9 ± 1.9	21.1 ± 5.3
LysoPC	1.3 ± 0.8	5.1 ± 1.0
Plasmalogen proportion		
Total plasmalogen (/PL) <sup>a</sup>	44.2 ± 4.6	35.3 ± 3.2
Total plasmalogen (/GPL) <sup>b</sup>	37.2 ± 3.5	38.1 ± 5.6
PCplsm (/PC) <sup>c</sup>	14.1 ± 6.0	13.4 ± 2.7
PEplsm (/PE)	87.9 ± 3.2	80.8 ± 2.8
PSplsm (/PS)	50.2 ± 9.8	58.8 ± 0.8

Results are expressed as mean ± standard error (n=3), in nmol PL.10<sup>-6</sup> cells for PL quantity and in mol% of total PL for PL composition and plasmalogen proportions.

<sup>a</sup> % of the plasmalogen forms to total phospholipids (including CAEP)

<sup>b</sup> % of the plasmalogen forms to the total glycerophospholipids (excluding CAEP)

<sup>c</sup> % of the plasmalogen form in each class composed of the diacyl + alkyl + plasmalogen forms.

### 3.1.3 FA COMPOSITION OF CL ,PI, CAEP AND LYSOPC

CL was composed of over 70% of only four FA: 22:6n-3, 20:5n-3, 16:0 and 18:0 (Table 10). SFA accounted for 26.1% of total FA in *M. arenaria* but reached 46.2% in *C. edule*. Proportion of 20:5n-3 was higher than the one of 22:6n-3 in both species (23.7% and 10.8% in *C. edule* and 38.0% and 26.3% in *M. arenaria*, respectively).

In *C. edule*, PI was composed of about 50% of two FA, 18:0 and 20:4n-6, accounting respectively for 24.5% and 25.1% of the total FA, followed by 20:5n-3 and 16:0 (12.5% and 9.1%, respectively) (Table 10). Differently, in *M. arenaria*, PI was composed at 60% of 16:0, 20:4n-6, 20:5n-3 and 18:0, each accounting respectively for 17.4%, 16.4%, 16.1% and 11.6% of total FA.

For both species, CAEP was mainly composed of SFA (94.6% and 88.9% of total FA, respectively in *C. edule* and *M. arenaria*) (Table 10). The main SFA was 16:0 (80.8% and 53.8% of total FA, respectively in *C. edule* and *M. arenaria*). The lower proportion of 16:0 observed in *M. arenaria*, when compared to *C. edule*, was concomitant to a higher proportion of branched FA (4.4% and 19.8% of total FA, respectively in *C. edule* and *M. arenaria*).

LysoPC was mainly constituted of SFA in both species (52.2% and 53.9%, in *C. edule* and *M. arenaria* respectively) (Table 10). MUFA accounted for 19.9% and 22.6% of total FA in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively. MUFA were mainly composed of 16:1n-7 and 18:1n-9 (6.4% and 6.5% for 16:1n-7; 8.3% and 7.5% for 18:1n-9, respectively in *C. edule* and *M. arenaria*). 20:1n-11 and branched FA were only present in *M. arenaria* (3.1% and 7.3%, respectively), whereas NMI FA were only present in *C. edule*, where they accounted for 12.9% of total FA. Other PUFA were mainly represented by 20:5n-3 and 22:6n-3, accounting together for 8.8% and 15.1% of total FA in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 10: Fatty acid (FA) composition of CL, PI, CAEP and LysoPC in hemocytes from *C. edule* and *Mya arenaria*.

FA	CL		PI		CAEP		LysoPC	
	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>
Branched <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.7 ± 1.4	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.1	19.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	7.3 ± 2.3
14:0	2.5 ± 0.0	0.3 ± 0.3	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.0	1.6 ± 0.7	0.8 ± 0.4	3.0 ± 0.8
15:0	2.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.4
16:0	15.6 ± 1.6	13.7 ± 1.6	9.1 ± 2.6	17.4 ± 1.7	80.8 ± 1.6	53.8 ± 3.0	33.5 ± 3.3	26.9 ± 2.0
17:0	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.8	3.8 ± 0.3	6.3 ± 2.3	2.9 ± 0.2	5.0 ± 1.3
18:0	23.7 ± 2.0	11.4 ± 2.4	24.5 ± 1.2	11.6 ± 0.2	3.6 ± 0.8	6.0 ± 1.1	17.9 ± 3.0	10.4 ± 1.0
16:1n-7	2.2 ± 0.1	1.6 ± 0.8	3.0 ± 1.5	4.2 ± 0.6	0.4 ± 0.2	3.1 ± 0.9	6.4 ± 1.3	6.5 ± 0.1
18:1n-9	5.2 ± 0.8	2.4 ± 0.3	2.6 ± 1.1	3.8 ± 0.8	1.4 ± 0.5	1.9 ± 1.2	8.3 ± 1.1	7.5 ± 0.8
18:1n-7	1.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.4	2.8 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.0	3.0 ± 0.3
20:1n-11	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.9	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.4
20:1n-9	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.5	2.4 ± 0.0	5.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.3 ± 1.4	1.1 ± 0.1
20:1n-7	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	7.0 ± 1.0	5.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.9	1.4 ± 0.2
18:2n-6	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.4	0.3 ± 0.0
20:xNMI <sup>b</sup>	1.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	3.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0
20:4n-6	2.0 ± 0.2	1.8 ± 1.0	25.1 ± 4.4	16.4 ± 0.7	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	2.3 ± 0.6	2.2 ± 0.2
20:5n-3	23.7 ± 2.3	38.0 ± 4.0	12.5 ± 2.4	16.1 ± 1.8	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.6	4.8 ± 1.6	8.7 ± 0.9
22:2NMI(7,13)	0.9 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	4.0 ± 1.2	0.0 ± 0.0
22:2NMI(7,15)	0.9 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0
22:3NMI(7,13,16)	1.9 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0
22:4n-6	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.1
22:5n-6	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.3
22:5n-3	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
22:6n-3	10.8 ± 0.8	26.3 ± 2.5	2.2 ± 0.6	5.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.4	4.0 ± 1.0	6.4 ± 0.9
Others <sup>c</sup>	1.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.9 ± 1.1
Total NMI	4.7 ± 2.3	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	12.9 ± 3.1	0.0 ± 0.0
Total SFA	46.2 ± 3.2	26.1 ± 4.3	39.9 ± 3.9	35.9 ± 0.5	94.6 ± 0.4	88.9 ± 0.9	55.2 ± 3.5	53.9 ± 3.6
Total MUFA	9.9 ± 0.2	6.9 ± 1.5	17.4 ± 2.0	23.3 ± 0.9	2.3 ± 0.4	6.1 ± 1.5	19.9 ± 2.5	22.6 ± 1.3
Total PUFA	43.8 ± 3.3	67.0 ± 5.6	42.7 ± 5.8	40.8 ± 1.4	3.1 ± 0.1	5.0 ± 0.6	24.9 ± 2.6	23.5 ± 2.5

Results are expressed as mean ± standard error (n=3), in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA.

### 3.1.4 FA COMPOSITION OF PC, PE AND PS DIACYL+ALKYL SUBCLASSES

In diacyl+alkyl fractions of PC and PS, proportion of SFA were similar between both species and reached values of 36.9% and 37.6% for PCdiacyl+alkyl and 50.7% and 42.7% in PSdiacyl+alkyl, respectively in *C. edule* and *M. arenaria* (Table 11). Differently, in PEdiacyl+alkyl, SFA proportion varied between species, being higher in *M. arenaria* (58.1%) than in *C. edule* (39.3%). Predominant SFA were 16:0 and 18:0. In PCdiacyl+alkyl, these two FA were found in similar proportion according to species: 22.8% and 26.8% of 16:0 and 8.0% and 5.3% of 18:0, respectively in *C. edule* and *M. arenaria*. In PEdiacyl+alkyl and PSdiacyl+alkyl, the distribution of 16:0 and 18:0 varied according to bivalve species: 16:0 predominated in *M. arenaria* (29.8% and 21.5%, respectively in PEdiacyl+alkyl and PSdiacyl+alkyl), whereas 18:0 predominated in *C. edule* (24.9% and 41.2%, respectively in PEdiacyl+alkyl and PSdiacyl+alkyl).

In all diacyl+alkyl fractions, MUFA proportion was higher in *M. arenaria* than in *C. edule* (9.8% and 16.4% of the total FA in PCdiacyl+alkyl, 12.4% and 15.6% in PEdiacyl+alkyl and 8.0% and 20.8% in PSdiacyl+alkyl, respectively for *C. edule* and *M. arenaria*) (Table 11). MUFA were composed of 16:1n-7, 18:1n-9 and 18:1n-7. Proportion of 20:1n-11 varied according to diacyl+alkyl fractions and species, reaching its highest level in PS diacyl+alkyl from *M. arenaria* (4.8%).

In diacyl+alkyl fractions of PC and PS, PUFA proportion was slightly higher in *C. edule* than in *M. arenaria* (53.4% and 46.0% of the total FA in PCdiacyl+alkyl and 41.3% and 36.5% in PSdiacyl+alkyl, respectively for *C. edule* and *M. arenaria*) (Table 11). In PEdiacyl+alkyl, this difference in PUFA proportion was accentuated (48.3% in *C. edule* and 26.3% in *M. arenaria*). The 20:5n-3 was the predominant PUFA in PEdiacyl+alkyl of *C. edule* (24.5% of total FA), while it only accounted for 5.9% in *M. arenaria*. In the two other subclasses, the proportion of 20:5n-3 was similar between species (28.6% and 24.7% of total FA in PCdiacyl+alkyl and 14.7% and 14.0% in PSdiacyl+alkyl, respectively for *C. edule* and *M. arenaria*). Proportion of 22:6n-3 in PSdiacyl+alkyl was higher in *M. arenaria* than in *C. edule*. In PE and PS diacyl+alkyl

fractions, 20:4n-6 and 22:6n-3 presented inverse patterns. *M. arenaria* presented higher 22:6n-3 proportions than *C. edule*. In PE<sub>diacyl+alkyl</sub> and PS<sub>diacyl+alkyl</sub>, NMI FA proportions reached relatively high levels in *C. edule* (7.5% and 14.8%, respectively), whereas they were present in low proportions in *M. arenaria* (3.5% and 0.2%, respectively).

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 11: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS in hemocytes from *C. edule* and *Mya arenaria*.

FA	PCdiacyl+alkyl		PEdiacyl+alkyl		PSdiacyl fraction	
	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>
Branched <sup>a</sup>	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.7	2.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.7
14:0	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.4	2.2 ± 0.5	0.8 ± 0.4	1.5 ± 0.2
15:0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.1
16:0	22.8 ± 2.5	26.8 ± 0.9	10.2 ± 1.2	29.8 ± 0.5	6.5 ± 3.1	21.5 ± 3.1
17:0	2.4 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.1	3.8 ± 0.9	1.7 ± 0.2	2.5 ± 0.3
18:0	8.0 ± 1.8	5.3 ± 0.1	24.9 ± 3.4	17.1 ± 0.6	41.2 ± 2.4	15.2 ± 1.1
16:1n-7	4.1 ± 0.8	6.8 ± 0.4	4.7 ± 1.1	3.7 ± 0.2	1.6 ± 1.0	5.8 ± 2.0
18:1n-9	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	2.3 ± 1.1	5.9 ± 0.4
18:1n-7	2.5 ± 0.0	4.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2
20:1n-11	0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	4.8 ± 0.4
20:1n-9	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1
20:1n-7	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.1
18:2n-6	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.0
20:xNMI <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.1
20:4n-6	5.0 ± 0.3	3.5 ± 0.0	5.7 ± 1.2	1.3 ± 0.1	7.7 ± 1.1	3.0 ± 0.2
20:5n-3	28.6 ± 2.0	24.7 ± 0.9	24.5 ± 1.2	5.9 ± 0.7	14.7 ± 1.4	14.0 ± 1.8
22:2NMI(7,13)	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1	7.6 ± 0.7	0.0 ± 0.0
22:2NMI(7,15)	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.1 ± 0.3	0.4 ± 0.0	4.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
22:3NMI(7,13,16)	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.0	2.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0
22:4n-6	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.1
22:5n-6	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.2 ± 0.5
22:5n-3	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.3
22:6n-3	12.5 ± 1.2	10.6 ± 0.8	6.5 ± 1.2	10.0 ± 1.0	2.4 ± 0.2	10.1 ± 1.1
Others <sup>c</sup>	3.5 ± 0.5	3.9 ± 0.1	1.4 ± 0.7	4.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	5.4 ± 2.5
Total NMI	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.2	7.5 ± 0.7	3.5 ± 0.4	14.8 ± 0.5	0.2 ± 0.2
Total SFA	36.9 ± 2.2	37.6 ± 1.7	39.3 ± 1.2	58.1 ± 1.9	50.7 ± 1.5	42.7 ± 2.9
Total MUFA	9.8 ± 0.3	16.4 ± 0.2	12.4 ± 0.8	15.6 ± 0.5	8.0 ± 1.5	20.8 ± 1.7
Total PUFA	53.4 ± 2.0	46.0 ± 1.7	48.3 ± 0.5	26.3 ± 1.5	41.3 ± 3.0	36.5 ± 4.6

Results are expressed as mean ± standard error (n=3) in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA.



### 3.1.5 SN-2 FA COMPOSITION OF PC, PE AND PS PLASMALOGEN SUBCLASSES

In both species, SFA content was found to be low in PEplsm (1.3% and 5.8% in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively) while higher proportions were observed in PSplsm (13.7% and 21.2% in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively) and in PCplsm (15.0% and 31.6% in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively) (Table 12). Major SFA were 16:0 and 18:0, with 16:0 higher than 18:0. However, particularly high proportions of branched FA were observed in PCplsm and PSplsm of *M. arenaria* (5.0% and 3.4% of the total FA, respectively), while they were absent from all plasmalogen fractions of *C. edule* hemocytes.

Proportion of MUFA was low in PCplsm of both species and in PEplsm and PSplsm of *C. edule* (Table 12). In *M. arenaria*, MUFA reached particularly high levels in PEplsm and PSplsm (18.1% and 20.5%, respectively). Main MUFA were 16:1n-7 and 18:1n-9 in PCplsm, whereas in PEplsm and PSplsm of both species, 20:1n-11 accounted for the greater part of MUFA. This pattern was particularly evident in *M. arenaria* where this FA reached 7.9% of total FA in PEplsm and 13.1% in PSplsm. A specific 20:1n-11 enrichment of aminoplasmalogen subclasses (PEplsm and PSplsm) was observed for both species. The proportion of 20:1n-11 in PEplsm was 1.6 and 2.6 times higher than in PEdiacyl+alkyl, in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively. Similarly, the proportion of 20:1n-11 in PSplsm was 3.7 and 2.7 times higher than in PSdiacyl+alkyl, in *C. edule* and *M. arenaria*, respectively.

PUFA level in plasmalogens was higher in *C. edule* than in *M. arenaria* (29.3% and 13.0% in PCplsm, 45.1% and 26.1% in PEplsm and 26.6% and 8.3% in PSplsm, respectively for *C. edule* and *M. arenaria*) (Table 12). *C. edule* hemocytes were characterized by high proportions of NMI FA in plasmalogens (5.5%, 21.4% and 18.1% in PCplsm, PEplsm and PSplsm, respectively), whereas they were almost absent from those of *M. arenaria*.

In *C. edule*, NMI FA proportions were higher in plasmalogen than in their respective diacyl+alkyl fractions (5.5% and 1.3% in PC, 21.4% and 7.5% in PE, and 18.1% and 14.8% in PS, respectively in plasmalogen and diacyl fractions) (Table 12). This revealed a specific

enrichment of plasmalogen subclasses by NMI FA in *C. edule*. In this species, the three main NMI FA were 22:2NMI(7,13), 22:2NMI(7,15) and 22:3NMI(7,13,16). 22:3NMI(7,13,16) was the predominant C22 NMI FA in PCplsm and PEplsm (2.2% and 9.7% respectively), whereas it was lower than the others C22 NMI in PSplsm (2.8%). In all plasmalogen subclasses, 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15) presented similar proportions.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

Table 12: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS in hemocytes from *C. edule* and *Mya arenaria*.

FA	PCplsm		PEplsm		PSplsm	
	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>M. arenaria</i>
Branched <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	5.0 ± 2.6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.4 ± 0.8
14:0	1.3 ± 0.0	0.9 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.4	1.4 ± 0.2
15:0	0.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.6	0.7 ± 0.1
16:0	8.7 ± 0.7	15.4 ± 2.9	0.7 ± 0.3	3.0 ± 0.6	6.9 ± 1.9	9.5 ± 0.8
17:0	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.8	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	2.4 ± 0.3
18:0	3.3 ± 0.5	8.4 ± 1.8	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.2	4.9 ± 1.6	3.9 ± 0.4
16:1n-7	2.1 ± 0.5	1.5 ± 0.8	0.2 ± 0.1	1.8 ± 0.6	1.0 ± 0.7	2.3 ± 0.2
18:1n-9	2.1 ± 0.6	3.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	2.6 ± 0.3	1.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4
18:1n-7	0.7 ± 0.0	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1
20:1n-11	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.3	2.2 ± 0.2	7.9 ± 0.7	5.9 ± 2.4	13.1 ± 1.6
20:1n-9	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.7	0.6 ± 0.1
20:1n-7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1
18:2n-6	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
20:xNMI <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.1 ± 0.1
20:4n-6	2.3 ± 0.2	0.6 ± 0.6	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.0
20:5n-3	11.7 ± 1.3	4.1 ± 2.0	6.9 ± 0.3	7.2 ± 0.9	2.9 ± 2.3	2.0 ± 0.2
22:2NMI(7,13)	1.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	5.8 ± 0.3	0.1 ± 0.1	7.7 ± 1.9	0.1 ± 0.0
22:2NMI(7,15)	1.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	4.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	6.8 ± 1.3	0.0 ± 0.0
22:3NMI(7,13,16)	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	9.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.8 ± 1.3	0.0 ± 0.0
22:4n-6	0.5 ± 0.3	1.4 ± 0.8	3.1 ± 0.4	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1
22:5n-6	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.4	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.0	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.0
22:5n-3	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.2	1.1 ± 0.0	2.9 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1
22:6n-3	6.7 ± 0.7	3.4 ± 1.8	8.3 ± 0.3	8.8 ± 0.5	3.0 ± 1.8	2.4 ± 0.1
Others <sup>c</sup>	0.9 ± 0.3	2.8 ± 2.1	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.5	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.4
Total NMI	5.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	21.4 ± 0.4	0.8 ± 0.3	18.1 ± 2.8	0.2 ± 0.1
Total SFA	15.0 ± 1.8	31.6 ± 5.5	1.3 ± 0.5	5.8 ± 0.9	13.7 ± 3.8	21.2 ± 1.9
Total MUFA	5.7 ± 1.0	5.4 ± 0.9	3.6 ± 0.3	18.1 ± 1.0	9.7 ± 3.1	20.5 ± 1.8
Total PUFA	29.3 ± 2.7	13.0 ± 4.5	45.1 ± 0.6	26.1 ± 1.9	26.6 ± 3.8	8.3 ± 0.5

Results are expressed as mean ± standard error (n=3) in mol% of total FA of the class. <sup>a</sup>Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. <sup>b</sup> 20:xNMI: mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). <sup>c</sup> Others: 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. The total percentage of *sn*-2 FA was adjusted to 50% to take into account the alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase.

## 3.2 DISCUSSION

Membrane lipid compositions of hemocytes from *C. edule* and *M. arenaria* presented similar general pattern than the ones of hemocytes from *C. gigas* and *R. philippinarum*, reinforcing the hypotheses of specific relationships between membrane lipid structures and functions of circulating hemocytes in bivalves.

CAEP content was found to be high in hemocytes of *C. edule* (12.9%), reaching the level observed in *C. gigas* (14.5%). In *M. arenaria*, CAEP proportion was even higher (21.1%) and was almost as high as in *R. philippinarum* hemocytes (27.9%). Moreover, CAEP FA composition of hemocytes from *C. edule* and *M. arenaria* was, as observed in *C. gigas* and *R. philippinarum*, highly saturated, reinforcing the structural analogy between CAEP and sphingomyelin and their possible similar functional roles, in lipid rafts, but also potentially in phagolysosome membrane stabilization. Interestingly, in *M. arenaria*, similarly to what was observed in *R. philippinarum*, high CAEP level was concomitant with high proportion of branched FA in CAEP, suggesting a specific association between these particular FA and CAEP.

As in *C. gigas* and *R. philippinarum*, LysoPC content was found to be high in hemocyte membranes from *M. arenaria* (5.1%). However, this was not the case for *C. edule* where LysoPC only accounted for 1.3% of total PL. As LysoPC is commonly known to be the result of the action of a phospholipase on a PCdiacyl, a lower amount and/or activity of phospholipases in hemocytes from *C. edule* than in those from *M. arenaria*, *C. gigas* and *R. philippinarum* could explain this observation.

PI FA composition of hemocytes from *C. edule* was similar to the one observed in PI from *R. philippinarum* hemocytes, being mainly composed of the commonly encountered molecular species 18:0/20:4n-6 in mammals (Wood and Harlow, 1969; Holub et al., 1970) as well as in the scallop *Pecten maximus* (Soudant et al., 1995; Soudant et al., 1996). PI of *M. arenaria* presented a different FA composition, with 18:0, 20:4n-6 but also 20:5n-3 observed

in similar proportions. This reinforced the hypothesis that species-specific PI FA composition could reflect PI-related mechanisms differing between species.

Similarly to *R. philippinarum*, PUFA in CL were predominated by both 22:6n-3 and 20:5n-3 of *M. arenaria* and *C. edule* hemocytes, whereas only 22:6n-3 predominated in CL PUFA of *C. gigas* hémocytes. This in agreement with 20:5n-3/22:6n-3 enriched CL of Heterodonta and 22:6n-3 enriched one of Filibranchia (Kraffe et al., 2008a). Nevertheless, high SFA levels were found in CL of *M. arenaria* and *C. edule* hemocytes, in accordance with those observed in *C. gigas* and *R. philippinarum*. Lower proportions of SFA were previously observed in CL from different bivalves species and organs (Kraffe et al., 2002; Kraffe et al., 2005; Kraffe et al., 2008a). The significance of a « saturated » characteristic of CL in hemocytes is still unknown but could have strong consequences in mitochondria functioning, according to the putative roles of CL FA composition on phosphorylative oxydation mechanisms. Indeed, Schlame et al. (Schlame et al., 2000) hypothesized that mammal mitochondria with stacked inner membranes ("muscle" type mitochondria) contain a higher proportion of tetralinoleoyl-cardiolipin (18:2n-6) than mitochondria with a more relaxed structure ("liver" type mitochondria), suggesting that the function of the high proportion of 18:2n-6 in mammals CL may perhaps be related to the density of packing in the membrane.

Plasmalogen content was high in hemocyte membranes of *C. edule* and *M. arenaria*, and even higher than those encountered in *C. gigas* and *R. philippinarum*, with similar repartition of plasmalogen vs. diacyl+alkyl forms in PE, PS and PC. This reinforced the hypothesis that the high plasmalogen content observed in hemocytes could have functional significance in hemocytes, particularly in defense-related mechanisms such as adhesion, aggregation or phagocytosis.

The marked specific enrichment of aminoplasmalogens (PEplsm and PSplsm) with NMI FA and 20:1n-11 observed in *C. gigas* and *R. philippinarum* was also observed in *C. edule* and *M. arenaria*. This feature is discussed in more details in the following section. These observations not only strengthened the hypothetical related roles of plasmalogens and NMI

FA and 20:1n-11, as previously hypothesized by Kraffe et al. (2004), but also suggest their implication in hemocyte-related function.

Study of hemocyte lipid composition of *C. edule* and *M. arenaria* allowed strengthening some membrane lipid particularities of bivalve hemocytes such as high CAEP and plasmalogen contents as well as a specific FA composition of plasmalogens. These features could be related to specific hemocyte functions. However, studying *C. edule* and *M. arenaria* revealed also some species specific features for some membrane lipid parameters. Among the most noticeable ones, the proportion of branched FA in CAEP linked to CAEP proportion varied according to species. Similarly, FA composition of PI of plasmalogens were species specific.

These differences can be the consequence of many exogenous and endogenous factors. The four studied bivalve species are phylogenetically distinct and do not have to cope with the same biotic and abiotic factors. *C. gigas*, an epifaunal Ostreidae, belongs to Filibranchia, whereas *R. philippinarum* and *C. edule* and *M. arenaria*, are endofaunal bivalves belonging to Heterodonta. Moreover, as previously assessed for *C. gigas* and *R. philippinarum*, the morphology and the functional characteristics of hemocytes may vary between species.

Finally, no clear differences were found in membrane lipid compositions of hemocytes between species according to disseminated neoplasia sensivity (*C. gigas* and *R. philippinarum* vs. *C. edule* and *M. arenaria*).

## 4 ACIDES GRAS « NON-METHYLENE-INTERRUPTED », 20:1N-11 ET PLASMALOGENES CHEZ LES QUATRE ESPECES DE BIVALVES ETUDIEES

Les deux premières parties de ce chapitre ont permis de mettre en évidence la particularité de la composition en acides gras (« non-méthylène interrupted » et 20:1n-11) des plasmalogènes dans les membranes des hémocytes, pour chacune des quatre espèces étudiées : *Mya arenaria*, *Cerastoderma edule*, *Ruditapes philippinarum* et *C. gigas*. Cette troisième partie, rédigée comme les deux premières en anglais par souci d'homogénéité, vise à étudier de façon plus détaillée la distribution de ces espèces moléculaires particulières.

### 4.1 NMI FA

The relative proportions of C22 NMI FA were found to be species specific. Indeed, when compared to the three other species, *C. edule* showed a high content of 22:3NMI(7;13,16), *C. gigas* was characterized by high proportions of 22:2NMI(7,15), *R. philippinarum* presented more balanced relative proportions between the three C22 NMI FA. and in *M. arenaria*, proportions of NMI FA were found only as traces.

Membrane lipids of *C. edule* hemocytes were found to contain high levels of 22:3NMI(7,13,16), when compared to 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15). These dienoic NMI FA has been extensively studied in marine bivalves but trienoic ones much less (Barnathan, 2009). In bivalves, presence of 22:3NMI(7,13,16) was reported in the freshwater mussel *U. timidus* (Stefanov et al., 1992), in *C. gigas* (Dunstan et al., 1993; Kraffe et al., 2004), in *M. edulis* (Zakhartsev et al., 1998; Garrido and Medina, 2002; Kraffe et al., 2004), in *M. galloprovincialis* (Ventrella et al., 2008), in *R. philippinarum* (Kraffe et al., 2004) and in *Megangulus sp.* (Kawashima and Ohnishi, 2004), but only in very low

proportions when compared to 22:2NMI, and thus has been little discussed. High proportion of 22:3NMI(7,13,16) NMI FA observed in *C. edule* is therefore an original pattern. A biosynthesis pathway for 22:3NMI(7,13,16) has been hypothesized (Dunstan et al., 1993; Garrido and Medina, 2002). 18:2n-6 would be elongated to form 20:2n-6, converted in 20:3NMI(5,11,14) by a  $\Delta 5$  desaturase, and finally elongated to 22:3NMI(7,13,16).

Proportions of 22:3NMI(7,13,16) and 22:2NMI(7,15) were negatively correlated ( $R^2 = 92\%$ ,  $p < 0.01$ ) in *C. gigas*, *R. philippinarum* and *C. edule* (Figure 41). At a lesser extent, proportions of 22:2NMI(7,15) and 22:2NMI(7,13) were also negatively correlated ( $R^2 = 77\%$ ,  $p < 0.1$ ). Different biosynthesis pathways of NMI FA could explain these two NMI FA sub-groups : 22:2NMI(7,15) vs. 22:3NMI(7,13,16) and 22:3NMI(7,13). Indeed, two types of  $\Delta 5$  desaturase may exist. The 1<sup>st</sup> one would be specific of C20 FA with a first double bond in  $\Delta 11$  position, in this case of 20:1n-9 and 20:2n-6, leading to the formation of 20:2NMI(5,11) and 20:3NMI(5,11,14), elongated in 22:2NMI(7,13) and 22:3NMI(7,13,16), respectively (Figure 42). The second one would be  $\Delta 13$  specific, starting from 20:1n-7 and leading to the formation of 20:2NMI(5,13) and of 22:2NMI(7,15) through elongation.

Species specific relative proportions of C22NMI FA could suggests  $\Delta 5$  desaturase species specificity ( $\Delta 13$  or  $\Delta 11$ ). High  $\Delta 11$  specificity in *C. edule* could explain the observed high relative level of 22:3NMI(7,13,16). At the opposite, in *C. gigas*, the  $\Delta 5$  desaturase would be  $\Delta 13$  specific; leading to such a high relative proportion of 22:2NMI(7,15).

Interestingly, for each of the three studied species, the relative levels of 22:2NMI(7,15) were lower in PEplsm than in PSplsm whereas the inverse was observed for the 22:3NMI(7,13,16) (Figure 41). Except in *C. gigas*, relative levels of 22:2NMI(7,13) were also higher in PSplsm than in PEplsm. This could suggest that, in bivalve hemocytes, NMI FA resulting from the activity of a  $\Delta 5$  desaturase  $\Delta 11$  specific would be preferentially incorporated in PSplsm, whereas those resulting from the activity of a  $\Delta 5$  desaturase  $\Delta 13$  specific would be preferentially incorporated in PEplsm.



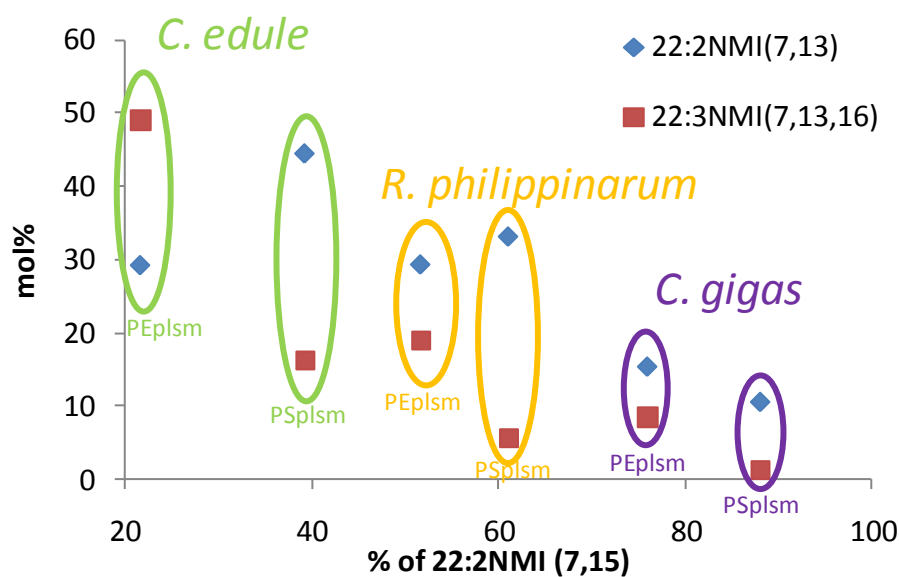


Figure 41: Relative proportion (in mol%) of 22:2NMI(7,13) and 22:3NMI(7,13,16) in function of 22:2NMI(7,15) in PEplsm and PSplsm from *C. edule*, *R. philippinarum* and *C. gigas*.

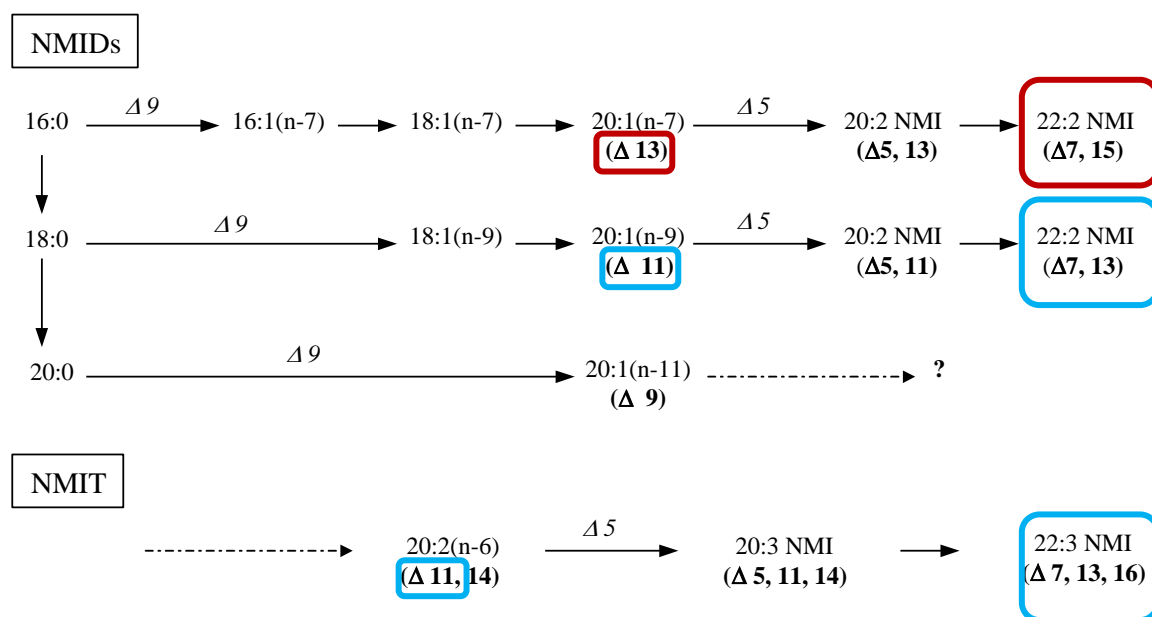


Figure 42: Rappel des voies de biosynthèse supposées des NMI et du 20:1n-11

## 4.2 NMI FA AND 20:1N-11

Considering the specific FA composition of PEplsm and PSplsm, *M. arenaria* was considered as a “20:1n-11” species, with NMI FA found only as traces. Considering the total bulk of 20:1n-11 in PL classes, 75% of this FA was found to be specifically associated to plasmalogens in *M. arenaria* (Table 13). In *C. edule*, *C. gigas* and *R. philippinarum*, considered as “NMI” species, 20:1n-11 was only found in low but significant amounts. Indeed, 81.0%, 69.1% and 77.5% of this FA was found to be specifically associated to plasmalogen, in *C. edule*, *C. gigas* and *R. philippinarum*, respectively. In these “NMI” species, this specific association of 20:1n-11 with plasmalogens was found to be similar to the one of NMI with plasmalogens (83.5%, 70.2% and 83.3% of NMI FA were specifically associated to plasmalogen, in *C. edule*, *C. gigas* and *R. philippinarum* respectively).

Quantitatively, NMI FA were found to be mainly incorporated into PEplsm. For 20:1n-11 the repartition was more balanced between both, particularly in *M. arenaria*, despite the fact that PEplsm was a much more important PL class. Therefore, and even more for a “20:1n-11” species, PSplsm could be considered, as the most specific plasmalogen sub class regarding this biosynthesized FA. Moreover, PSplsm was also the more specific plasmalogen subclass taking into account the importance of NMI FA over other PUFA (or total FA) of the subclass.

Table 13: Distribution of NMI FA and 20:1n-11 in PL classes and subclasses of *Mya arenaria*, *Cerastoderma edule*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Only the percentage of NMI FA and 20:1n-11 that is associated to PEplsm, PSplsm and total plasmalogen is indicated.

FA	PL	<i>M. arenaria</i>	<i>C. edule</i>	<i>C. gigas</i>	<i>R. philippinarum</i>
NMI FA	PEplsm	24.1	75.1	60.7	68.9
	PSplsm	4.9	6.5	8.9	13.0
	Total plsm	<b>30.0</b>	<b>83.5</b>	<b>70.2</b>	<b>83.3</b>
20:1n-11	PEplsm	43.9	60.5	47.8	57.4
	PSplsm	41.5	18.5	21.3	19.4
	Total plsm	<b>75.0</b>	<b>81.0</b>	<b>69.1</b>	<b>77.5</b>

## 5 CONCLUSION

Les membranes des hémocytes des 4 espèces de bivalves analysées présentent la particularité d'être très riches en CAEP et en plasmalogènes spécifiquement enrichis en acides gras NMI, chez *C. edule*, *C. gigas* et *R. philippinarum*, et en 20:1n-11 chez *M. arenaria* (Figure 43A,C et D).

Néanmoins, certaines caractéristiques lipidiques de ces hémocytes varient selon l'espèce considérée. Les teneurs en CAEP et leur contenu en acides gras branchés sont particulièrement forts chez *M. arenaria* et *R. philippinarum* (Figure 43B). La composition relative en acides gras C22NMI au sein des plasmalogènes varie également en fonction des espèces. Ainsi, la coque *C. edule* présente une forte proportion de 22:3NMI(7;13,16), l'huître *C. gigas* est caractérisée par des proportions de 22:2NMI(7,15) très élevées, tandis que la palourde *R. philippinarum* présente les trois acides gras C22NMI en proportions plus équilibrées (Figure 43E).

Différentes hypothèses concernant certains PL et leurs rôles potentiels dans les fonctions hémocytaires ont été émises. Le CAEP a, par exemple, été supposé comme étant localisé préférentiellement dans les membranes des phagolysosomes. Cette hypothèse pourrait être testée en isolant ces vésicules, d'une manière similaire à ce qui peut être réalisé pour l'étude des mitochondries (Kraffe et al., 2007; Kraffe et al., 2008b) et en analysant leur teneur en CAEP. Les plasmalogènes ont également été suggérés comme ayant un rôle dans le processus de formation des pseudopodes, phénomène clé de la phagocytose. De plus, il existe différents types d'hémocytes, généralement divisés en deux sous-populations, les granulocytes et les hyalinocytes. Les granulocytes diffèrent notamment des hyalinocytes par un contenu en granules intracytoplasmiques (comme les phagolysosomes), et une capacité de phagocytose, plus élevés (Cheng, 1996; Chu, 2000). Il serait donc intéressant d'analyser séparément la composition lipidique de ces deux sous-populations hémocytaires, après un tri effectué par cytométrie en flux, afin de tester l'hypothèse de

granulocytes contenant des proportions plus élevées de plasmalogènes et de CAEP dans leurs membranes.

D'autre part, les hémocytes étant supposés avoir un rôle essentiel dans l'homéostasie des bivalves (Donaghy et al., 2009), cela suggère qu'ils auraient une capacité d'adaptation particulièrement élevée face à différentes variations de facteurs abiotiques (T°C, disponibilité en O<sub>2</sub>, ...) ou biotiques (statut reproducteur, pathologie, ...), afin de maintenir leurs fonctions cellulaires à un niveau optimal et d'assurer une défense cellulaire efficace. Ainsi, afin de préciser les rôles potentiels des PL et plus particulièrement de certaines espèces moléculaires de PL, il serait intéressant d'étudier l'un de ces paramètres et d'analyser les modifications hémocytaires potentiellement induites. C'est ce qui a été réalisé lors de cette thèse en testant l'effet de la néoplasie disséminée sur les compositions lipidiques membranaires et sur les fonctions cellulaires spécifiques des hémocytes, chez la coque *C. edule* et chez la mye *M. arenaria*.

## Chapitre1 : Composition lipidique des hémocytes

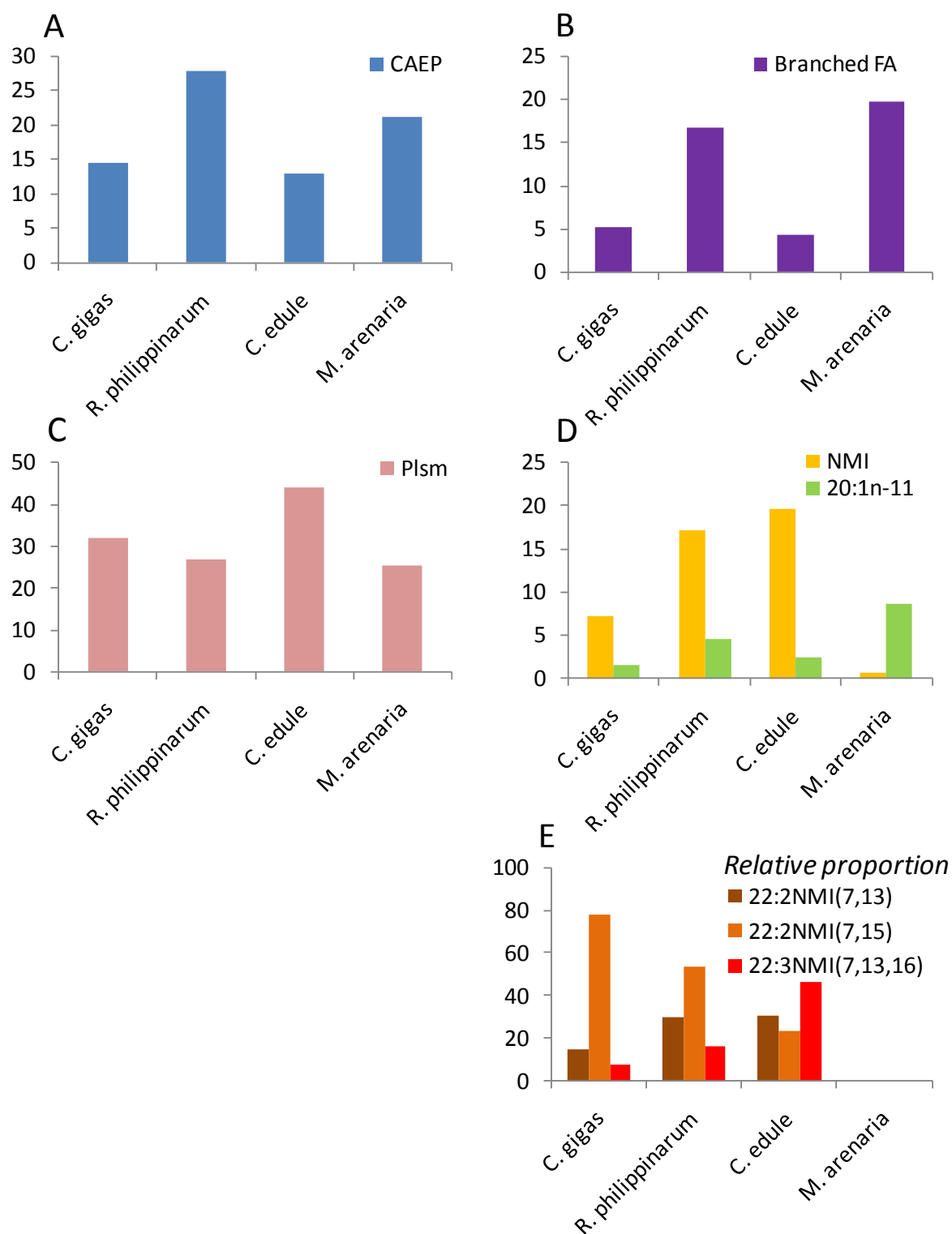


Figure 43: Principales caractéristiques de la composition lipidique membranaire d'hémocytes de *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum*, *Cerastoderma edule* et *Mya arenaria*. Les données sont des moyennes exprimées en mol% (n=5 pour *C. gigas* et *R. philippinarum*, n=3 pour *C. edule* et *M. arenaria*). A : Proportion de CAEP. B : Proportion d'acides gras branchés dans le CAEP. C : Proportion de plasmalogènes. D : Proportions d'acides gras NMI et de 20:1n-11 dans les plasmalogènes. E : Proportions relatives des acides gras C22NMI dans les plasmalogènes.



# **CHAPITRE 2 :**

## **NEOPLASIE DISSEMINEE**





## CHAPITRE 2 : NEOPLASIE DISSEMINEE

### 1 INTRODUCTION

Afin de mieux comprendre les relations structure-fonction au sein des membranes d'hémocytes de bivalves, l'effet de la néoplasie disséminée a été testé sur ces cellules.

La néoplasie disséminée est une pathologie touchant les bivalves caractérisée par une prolifération incontrôlée de cellules cancéreuses, les cellules néoplasiques, dans l'hémolymph des individus affectés (Elston et al., 1992; Barber, 2004). Cette maladie est progressive et invasive : la concentration de cellules néoplasiques augmente dans l'hémolymph, puis elles envahissent les organes des individus malades au fur et à mesure que le cancer se développe (Cooper et al., 1982; Mix, 1983; Brousseau and Baglivo, 1991). Ces cellules néoplasiques présentent généralement une morphologie moins complexe, ainsi qu'une taille et un ratio noyau/cytoplasme plus élevés que ceux des hémocytes normaux. Ces cellules présentent également la particularité d'être aneuploïdes, c'est-à-dire qu'elles ont un contenu en ADN différent de celui des cellules normales diploïdes  $2n$ , généralement supérieur. Cette caractéristique permet le diagnostic de la néoplasie disséminée par cytométrie de flux (Reno et al., 1994; Collins, 1998; da Silva et al., 2005; Delaporte et al., 2008).

Une étape préliminaire à des études des relations structuro-fonctionnelles en relation avec la néoplasie disséminée a consisté à étudier finement les caractéristiques de cette pathologie chez les espèces étudiées. Des paramètres généraux tels que la prévalence et l'intensité de cette pathologie ont été déterminés. D'autres caractéristiques plus spécifiques telles les évolutions de concentration, de morphologie et de ploïdie des cellules en fonction du stade de développement de la maladie ont également été étudiées. Les espèces choisies

pour cette étude étaient la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria*, connues pour être régulièrement atteintes de néoplasie disséminée (Elston et al., 1992; Barber, 2004).

Dans le cas de la coque, des populations avaient été reportées comme touchées par cette pathologie en Irlande et en Galice (Espagne) (Collins, 1998; Villalba et al., 2001). Cependant, c'est une population du bassin d'Arcachon que nous avons étudiée. En effet, la présence de cette maladie chez les coques d'Arcachon a été mise en évidence pour la première fois lors de cette thèse. La caractérisation plus poussée de la maladie, lors d'un suivi annuel 2007-2008 et d'une étude surface-profondeur, ont fait l'objet d'une publication parue dans « Journal of Invertebrate Pathology » (104, 110-118) : « **Prevalence, intensity and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay : Seasonal variation and position in sediment** » (Le Grand et al., 2010) qui constitue la première partie de ce chapitre.

Dans le cas de la mye, c'est une population de l'île du Prince Edouard (Canada), précédemment montrée comme étant touchée par la néoplasie disséminée (Delaporte et al., 2008), qui a été choisie comme modèle. Les mêmes paramètres ont été analysés chez la mye comme chez la coque, mais nous n'avons pu réaliser qu'un seul point d'échantillonnage (mai 2008). Les résultats de cette étude sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre et sont discutés et comparés avec ce qui a pu être observé chez les coques du bassin d'Arcachon.

En parallèle de la présente thèse, la détermination de l'état de santé, des stress auxquels était soumises des populations de coques et de palourdes provenant du bassin d'Arcachon et de Landéda (Finistère), et des réponses à ces stress a également été réalisée. Ceci a été rendu possible grâce à un travail pluridisciplinaire, réalisé dans le cadre du programme de l'Agence Nationale de la recherche « Multistress » (resp. X. de Montaudouin), qui a nécessité la collaboration des laboratoires LEMAR (Plouzané, UMR CNRS 6539) et EPOC (Arcachon, UMR CNRS 5805). Ces travaux ont donné lieu à une publication à laquelle j'ai participé, parue dans « Marine Pollution Bulletin » (60, 1307-1318) « **Bivalve population health: Multistress to identify hot spots** » (de Montaudouin et al., 2010) et jointe en annexe 1.

**2 PREVALENCE, INTENSITE ET CARACTERISTIQUES DE L'ANEUPLOÏDIE DE LA  
NEOPLASIE DISSEMINEE CHEZ LES COQUES (*CERASTODERMA EDULE*) DU BASSIN  
D'ARCACHON : VARIATION SAISONNIERE ET POSITION DANS LE SEDIMENT**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)



## Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment

Fabienne Le Grand<sup>a</sup>, Edouard Kraffe<sup>a</sup>, Xavier de Montaudouin<sup>b</sup>, Antonio Villalba<sup>c</sup>, Yanic Marty<sup>a</sup>, Philippe Soudant<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Bretagne Occidentale, UMR 6521, 29200 Brest, France

<sup>b</sup> Université Bordeaux 1, Station Marine d'Arcachon, UMR 5805, 33120 Arcachon, France

<sup>c</sup> Centro de Investigaciones Marinas, Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa 22, Spain

<sup>d</sup> LEMAR UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 18 September 2009  
Accepted 30 January 2010  
Available online 14 February 2010

Keywords:  
*Cerastoderma edule*  
Disseminated neoplasia  
Seasonal survey  
Flow cytometry  
Histology  
DNA content

### ABSTRACT

The present report presents the first evidence of disseminated neoplasia (DN) in cockles *Cerastoderma edule* from Arcachon Bay (France). Aneuploidy of neoplastic cells allowed the use of flow cytometry (FCM) to diagnose and stage DN. A 1 year survey (2007) of the prevalence and intensity (% of aneuploid circulating cells in neoplastic cockles) was conducted. Prevalences ranged from 2.2% (June) to 13.6% (May), and disease intensity ranged from 18.7% (June) to 95.5% (September). These percentages were not correlated with seawater temperature, but rather showed unexplained oscillations over the year. Prevalence and intensity of DN were higher in cockles found at the surface of sediment compared to those buried normally (11.8% vs. 6.7% and 53.0% vs. 40.6%, respectively,  $p < 0.05$ ). DN could thus be one mechanism leading to unexplained presence of cockles at the surface of the sediment in Arcachon Bay. Ploidy characteristics of neoplastic cells were also investigated using FCM, revealing an unusual, broad continuum of ploidy distribution from 1.6 to 9.6n. Ploidy values were not in whole numbers in contrast to the rounded values reported in other studies. Ploidy varied according to DN intensity, with the ploidy distribution of neoplastic cells from lightly-diseased cockles being unimodal (3.7n median). In contrast, highly-diseased cockles showed a bimodal ploidy distribution (3.0n and 4.7n medians). This suggests that, in cockles from Arcachon Bay, mechanisms leading to aneuploidy are complex, developing during disease progression.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Disseminated neoplasia (DN), also termed hemic, hematopoietic, hematic neoplasia, or sarcoma, is one of the two predominant types of malignant neoplasia that occurs rather widely in marine bivalves. This leukemia-like disease is characterized by an excessive proliferation of abnormal circulating cells in the circulatory system and organs (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). These abnormal cells, named the neoplastic cells, are larger, anaplastic, less complex (undifferentiated and round-shaped), and have a larger nucleus, a higher nucleus-to-cytoplasm ratio, and are mitotically more active compared to the normal circulating cells, the hemocytes (Farley, 1976; Mix et al., 1979; Poder and Auffret, 1986; Elston et al., 1992; Villalba et al., 2001). DN is progressive, with neoplastic cells showing

rapid and invasive growth that, in most of cases, results in the death of the host (Cooper et al., 1982; Elston et al., 1988; Barber, 1990; Brousseau and Baglivo, 1991). Neoplastic cells appear to replace both normal hemocytes and other non-circulating cells in the terminal stage of the disease (Peters, 1988; Elston et al., 1992). DN has proven to be transmissible between individuals in different bivalve species (Sunila, 1994; Weinberg et al., 1997; Collins and Mulcahy, 2003; Walker et al., 2009), which indicates that an infective agent, probably a retrovirus, could be involved (Oprandy et al., 1981; Oprandy and Chang, 1983; House et al., 1998; Romalde et al., 2007; AboElkhair et al., 2009a).

Since the initial description by Farley (1969a,b) in oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*), DN was observed in 15 molluscan species from various ecosystems and geographic areas, including several commercially-important species and was reported in populations suffering mass mortalities (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). In the edible cockle, *Cerastoderma*

\* Corresponding author. Fax: +33 2 98 49 86 45.  
E-mail address: [Philippe.Soudant@univ-brest.fr](mailto:Philippe.Soudant@univ-brest.fr) (P. Soudant).

*edule*, DN was first described in 1982 in Cork Harbour (Ireland) (Twomey and Mulcahy, 1984, 1988), and at approximately the same time in Brittany (France) (Auffret and Poder, 1986; Poder and Auffret, 1986). More recently, this pathological condition was detected in cockles from Galicia (Spain) (Rodríguez et al., 1997; Carballal et al., 2001; Villalba et al., 2001; Ordas and Figueras, 2005).

Although DN diagnosis is often based on hematocytology, coupled or not with histological organ examination (Brousseau, 1987; Elston et al., 1988; Brousseau and Baglivo, 1991; McGladdery et al., 2001; Villalba et al., 2001; Dungan et al., 2002), flow-cytometric methods (FCM) have been increasingly used (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Collins, 1998; Valet, 2003; Darzynkiewicz et al., 2004; da Silva et al., 2005; Smolarz et al., 2005; Delaporte et al., 2008). Those studies established that neoplastic cells are characterized by abnormal amounts of DNA (DNA aneuploidy), which can vary between species, and different from that of normal diploid cells.

DN in cockles from Arcachon Bay was first detected accidentally during a routine field survey. As this disease had not been reported previously in this area, a more exhaustive study of DN in Arcachon Bay was conducted and is presented here. The aims of the present study were to: (i) monitor the prevalence and intensity of this disease during a 1 year survey, (ii) compare disease intensity in buried (normal position) and unburied cockles (abnormal position), and (iii) assess aneuploid patterns and changes in cell ploidy relative to disease development.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling site

Cockles (*Cerastoderma edule*) were collected from a natural bed at Banc d'Arguin in Arcachon Bay. Arcachon Bay (44°40'N, 1°10'W) is a 180 km<sup>2</sup> macrotidal, shallow lagoon on the southwestern Atlantic coast of France. Banc d'Arguin is situated at the entrance of the bay in the most oceanic part and is characterized by constant salinity (34–35 psu) and water temperature that varies seasonally between 9.5 °C and 21 °C. In intertidal areas where cockles live, sediment temperatures fluctuate between –1 °C and 32 °C. Sediments consist of medium sand (median grain size = 360 µm). Adult cockle abundance was approximately 50 ind m<sup>-2</sup> during the survey.

### 2.2. Cockle sampling and annual survey

Two-hundred cockles (100 in April) were collected eight times from February to December 2007 (i.e. every 45 days) for a seasonal survey. Cockles collected were of approximately the same size (market size 30 mm shell length) and from the same depth in the sediment (0.5–3 cm beneath the surface, a typical depth). To compare two cockle positions in sediment (buried vs. unburied), two additional samplings of 200 and 500 cockles were performed in February 2008 and March 2009, respectively. Cockles were sampled either in natural buried position (100 and 180 cockles, respectively) or at the sediment surface (100 and 320 cockles, respectively). The latter position is often considered as a prelude to death (Desclaux et al., 2002). A total of 2200 cockles were thus collected. The 100 buried cockles collected in February 2008 were used for both studies (buried/unburied and seasonal). Once collected, cockles were used immediately for analysis or placed in a circulating seawater system in the laboratory for no more than two days. Seawater temperature was measured on site on all sampling dates.

### 2.3. Hemolymph sampling

Hemolymph from each of the 2200 cockles was withdrawn from the posterior adductor muscle through the shell hinge using a sterile, 25-gauge hypodermic needle attached to a 1 mL plastic syringe. Hemolymph from each cockle was transferred into an individual microtube and kept cold on crushed ice to prevent hemocyte aggregation. Hemolymph samples were then examined microscopically for contamination before further use. Hemolymph of cockles with moderate to high proportions of abnormal cells appeared cloudy (almost white in very severe cases), with increasing density of the abnormal cells. Any hemolymph sample deemed to be of low quality was not kept. After this selection, the numbers of hemolymph samples were thus reduced from 2200 to 1838. The evaluation of seasonality was conducted on 1236 hemolymph samples; whereas, the buried/unburied study was limited to 676 samples. Seventy-four hemolymph samples, corresponding to the buried individuals collected in February 2008, were common to the two studies.

### 2.4. Hemolymph cell-monolayers and histological sections

Two light microscopy-techniques were used for morphological characterization of DN in cockles of Arcachon Bay: examination of hemolymph cell-monolayers and of histological sections. A hemolymph fraction from 56 of the 1236 hemolymph samples of the seasonal survey was used for hemolymph cell-monolayer analysis. Between 9 and 14 hemolymph samples were selected from each of the five sampling dates between July 2007 and February 2008. Hemolymph samples were selected randomly within diseased and non-diseased groups to finally obtain 50% diseased cockles and 50% healthy individuals for each of these sampling dates. Hemolymph samples were considered to be “healthy” if no abnormal cell was observed and as “diseased” if one or more neoplastic cells were observed upon microscopic observation of fresh, non-stained samples. Although such diagnosis on fresh samples was rapid and gross, further hemolymph cell-monolayer and FCM analyses revealed that this provided a reliable estimation of DN presence and development.

Hemolymph cell-monolayer was performed by cell adhesion onto glass slides through cytocentrifugation. For this, 50 µL hemolymph was mixed with 100 µL of cold-modified Alsever's anti-aggregant solution (glucose: 20.8 g L<sup>-1</sup>; sodium citrate: 8 g L<sup>-1</sup>; EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): 3.36 g L<sup>-1</sup>; NaCl: 22.3 g L<sup>-1</sup>) (Bachère et al., 1988) and centrifuged at 92g for 5 min at 4 °C using a cytocentrifuge. The resulting hemolymph cell-monolayers were subsequently fixed and stained with a Hemacolor kit obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

In October 2007, the 14 cockles corresponding to the 14 hemolymph samples selected for hemolymph cell-monolayer analyses were processed for histological analysis. Histological sections were prepared from gills, visceral mass + gonad, adductor muscles, foot and mantle lobes of all selected cockles by excising ~5 mm thick sections of meat. Sections were then fixed in Bouin's solution (Howard and Smith, 1983). Subsequently, samples were dehydrated through an ascending ethanol series and embedded in paraffin. Five micrometer thick sections were stained with Harris' hematoxylin and eosin (Howard and Smith, 1983).

Hemolymph cell-monolayers and histological sections were examined under a light microscope for the presence of abnormal cells related to neoplasia. Intensity of DN was staged using the criteria of Brousseau and Baglivo (1991) for hemolymph cell-monolayers; whereas, a modified protocol from Mix (1983) was used for histological sections. Based upon abnormal cell proportion, three different development stages of DN were differentiated. Cockles were classified as “healthy” when no neoplastic cells were



observed in hemolymph nor in organs, as “light to moderately-diseased” when less than 50% of hemolymph cells were neoplastic and when isolated neoplastic cells were observed in gills and visceral mass + gonad, and, finally, as “highly-diseased” when more than 50% of hemolymph cells were neoplastic, when neoplastic cells foci were observed in gills and visceral mass + gonad, and when isolated neoplastic cells were observed in the adductor muscles, mantle and foot.

### 2.5. Flow cytometry

FCM measurements of DNA content in cockle hemolymph cells were performed on the 1838 selected individuals, for both studies (buried/unburied study and seasonality), according to da Silva et al. (2005). The FCM protocol was based on the properties of propidium iodide (PI), which stains by intercalating into double stranded nucleic acid molecules, giving fluorescence intensity proportional to the DNA cell content (Krishan, 1975). All samples were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at a wavelength of 488 nm. For each sample, particles were counted for 1 min (or 50000 particles maximum) at a high flow rate ( $60 \mu\text{L min}^{-1}$ ). PI fluorescence was detected on FL<sub>2</sub> detector (orange-red fluorescence detector, 564–606 nm). Data were then analyzed using the FCM analysis software WinMDI as described by da Silva et al. (2005). Although changes in the number or composition of individual chromosomes were not measured directly by karyotyping, cytogenetic terminology such as aneuploidy, triploidy, tetraploidy or hyper/hypoploidy, was used.

To define a reliable FCM diagnostic method of DN, two criteria were defined statistically to establish the limits between a normal, diploid cell ( $2n$ ) and a neoplastic, aneuploid cell according to measured DNA content. Cells were considered as aneuploid when ploidy was less than  $1.75n$  (hypoploidy) or higher than  $2.25n$  (hyperploidy) (Fig. 1a–d). This interval was set according to the confidence interval ( $\alpha = 0.01$ ) of the mean ploidy of normal  $2n$  cells from 1838 samples. Furthermore, discriminating neoplastic from healthy cockles was not always obvious as healthy cockles can also contain a few percent of tetraploid cells. These cells, which are normal diploid cells caught in division ( $2 \times 2n$ ), can thus be confused with tetraploid, neoplastic cells ( $4n$ ). According to the first criteria based on DNA content of normal  $2n$  cells, cells can be considered as normal dividing cells when their ploidy was between  $3.5n$  ( $1.75n \times 2$ ) and  $4.5n$  ( $2.25n \times 2$ ). The limit between healthy and lightly-diseased cockles was statistically set using the normal distribution of the percentage of  $3.5n$ – $4.5n$  cells in all hemolymph samples showing <50% aneuploid cells ( $n = 1743$ ). Cockles with percentages of  $3.5n$ – $4.5n$  cells ranging from 0.5–15% at 95% confidence interval were considered to be healthy, undergoing “basal” cell-division. This FCM threshold value of 15%  $3.5n$ – $4.5n$  cells, discriminating healthy from diseased cockles, was in good agreement with hemolymph cell-monolayer diagnosis.

At each sampling date and/or sampling position in the sediment, DN prevalence and intensity were determined. DN prevalence was calculated as the percentage of diseased cockles. DN intensity was rated, in diseased cockles, as the percentage of neoplastic cells in total circulating cells detected by FCM in hemolymph. For further analysis, disease was ranked according to the percentage of aneuploid cells obtained by FCM: stage 0, only  $1.75n$ – $2.25n$  cells and <15% of  $3.5n$ – $4.5n$  cells; stage 1, up to 50% aneuploid cells; stage 2, 50–75% aneuploid cells; and stage 3, more than 75% aneuploid cells (Fig. 1a–d). All FCM results obtained from diseased individuals, both from the seasonality and buried/unburied studies ( $n = 143$ ), were used in a detailed DNA content analysis.

### 2.6. Statistics

Shapiro–Wilks and Chi<sup>2</sup> tests were used, respectively, to assess normal and uniform distributions. The Chi<sup>2</sup> test was also used to test if two or more samples had the same distribution. Normality of the data distribution (Shapiro–Wilks test) and homoscedasticity (Levene test) were tested. Two means were compared using a *t*-test and more than two means by a one-way ANOVA followed by the *a posteriori* Fisher PLSD test. Before mean comparison, percentages were transformed to  $\arcsin(\text{square root}(x))$ . Pearson linear correlations were used to test for potential relationships between two variables. Statistical analyzes were processed with the software Statistica (StatSoft Inc., Version 8.0). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. The probability threshold was set at  $\alpha = 0.05$  (unless otherwise stated).

## 3. Results

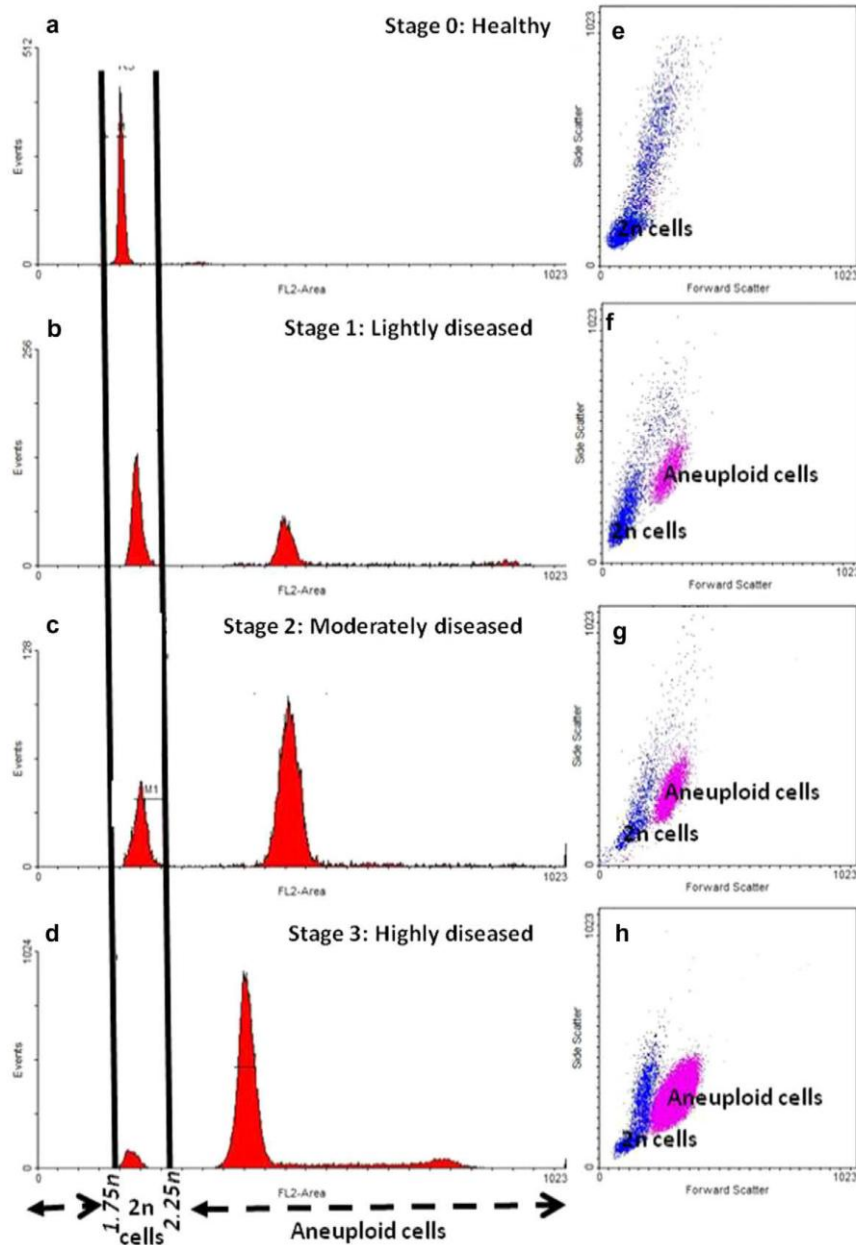
### 3.1. Evidence of disseminated neoplasia

Hemolymph cell-monolayers from “healthy” cockles (Fig. 2; photo a) showed hemocytes with nucleus stained dark purple and cytoplasm light purple. No abnormal cells were observed. In hemolymph cell-monolayers from “light to moderately-diseased” or “highly-diseased” cockles (Fig. 2, photos d and g, respectively) abnormal cells were observed in different proportions. The remarkable characteristics of these abnormal cells compared to hemocytes were: larger cell and nucleus size and rounded-cell shape. The higher size of abnormal cells when compared to hemocytes was confirmed by significantly higher forward scatter values ( $271 \pm 6$  vs.  $148 \pm 13$  expressed in arbitrary units) (Fig. 1e–h). Cell densities in hemolymph increased as the proportion of abnormal cells increased (Fig. 2, photos a, d and g).

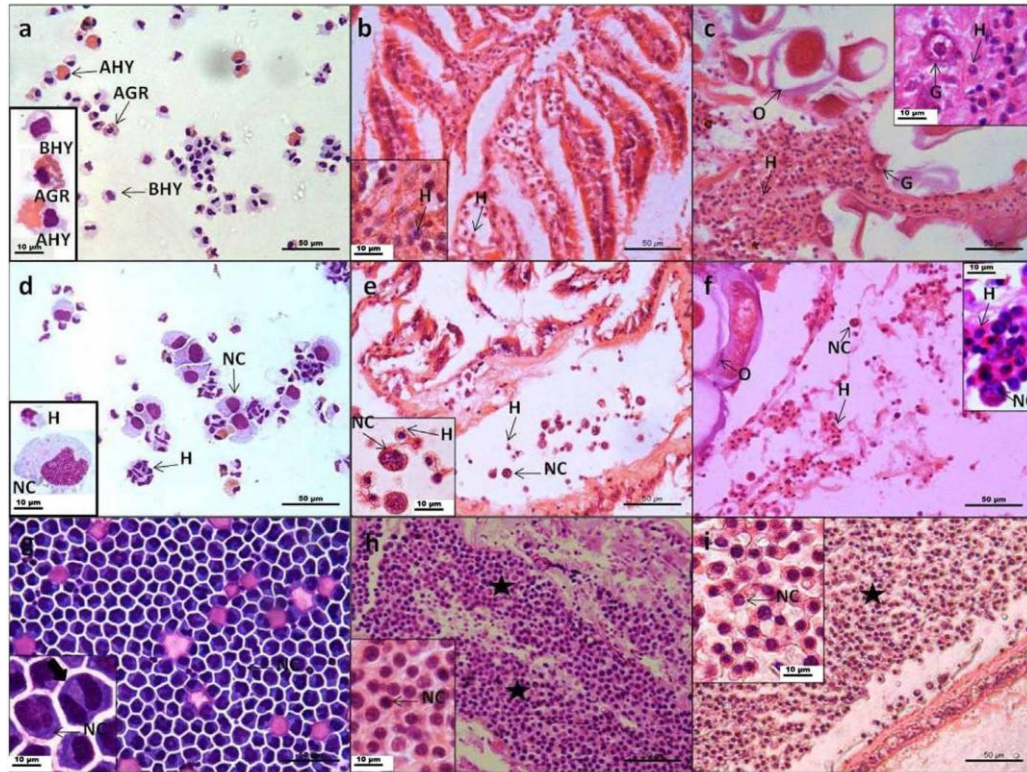
Histological section of gills and visceral mass + gonad from cockles considered to be “healthy” (Fig. 2, photos b and c, respectively) showed that hemocytes were the only circulating cells present in these organs. In contrast, histological section from “light to moderately-” or “highly-diseased” cockles (Fig. 2, photos e and h in gills and photos f and i in visceral mass, respectively) showed numerous abnormal circulating cells. The density of abnormal cells in the organs increased as disease stage increased. “Light to moderately-diseased” cockle organs contained only isolated, abnormal cells (Fig. 2, photos e and f), whereas these abnormal cells were organized in large foci in “highly-diseased” cockle organs (Fig. 2, photos h and i). In those “highly-diseased” cockles, infiltration of abnormal cells involved loss of the normal organ architecture.

### 3.2. Evaluation of disseminated neoplasia seasonality

The percentage of diseased cockles was not consistent throughout the year (assessed in 2007; Chi<sup>2</sup> = 24.0; ddl = 8;  $p < 0.05$ ), with June having the lowest (2.2%) and May the highest (13.6%) (Table 1). The percentage of diseased cockles was not correlated with water temperature ( $p > 0.05$ ) but rather showed unexplained oscillations over the year. In diseased cockles, over the course of the year, mean percentage of stage 1 cockles ( $64.3 \pm 10.3\%$ ) was significantly higher than stage 2 and 3 percentages ( $7.7 \pm 2.7\%$  and  $27.9 \pm 11.1\%$ , respectively,  $p < 0.05$ ). As a consequence of the low percentage of stage 2 cockles among diseased cockles, stages 1 and 3 percentages were negatively correlated ( $R^2 = 0.97$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ). None of the percentages of stage 1, stage 2 and stage 3 cockles were correlated with water temperature ( $p > 0.05$ ). Mean disease intensity in the cockle population varied significantly throughout the year ( $p < 0.05$ ), with a minimum in June 2007 ( $18.7\% \pm 2.0\%$ ) and a maximum in September 2007 ( $95.5\% \pm 1.0\%$ ).



**Fig. 1.** (a–d) Examples of flow cytometry histograms of hemolymph cells from the cockle *Cerastoderma edule*. Peaks represent the distribution of single cells, previously gated on a FL2-width vs FL2-area dotplot, according to DNA content. Markers at ploidy 1.75n and 2.25n delimited the gate of normal, diploid cells. Cells not in this gate were considered to be aneuploid and, thus, neoplastic. (a) Cells from a healthy cockle. There are only 1.75n–2.25n cells and <15% of 3.5n–4.5n cells (stage 0). (b) Cells from a lightly-diseased cockle. Less than 50% of the cells are aneuploid (stage 1). (c) Cells from a moderately-diseased cockle. Between 50% and 75% of the cells are aneuploid (stage 2). (d) Cells from a highly-diseased cockle. More than 75% of the cells are aneuploid (stage 3). (e–h) Dotplots representing the forward scatter (size) and side scatter (complexity) values of the 2n cells and aneuploid cells gated in each peak of the corresponding histograms (a–d).



**Fig. 2.** Light-microscopic photos of hemolymph cell-monolayers (a,d,g), gill histological sections (b,e,h) and visceral mass + gonad histological sections (c,f,i) from cockles (*Cerastoderma edule*) showing different disseminated neoplasia stages: healthy (a-c), light to moderately diseased (d-f) and highly-diseased (g-i). Coloration Hemacolor kit (a,d,g) or Harris' eosin-hematoxylin (b,c,e,f,h,i). Magnification 40× or 100× (inserts). H: hemocytes (BHY: basophil hyalinocyte; AHY: acidophil hyalinocyte; AGR: acidophil granulocyte); NC: neoplastic cell; G: gonia or non-mature reproductive cell; O: ovocyte; large arrow (photo g insert): neoplastic cell in mitosis; star (photos h and i): cluster of neoplastic cells.

**Table 1**

Seasonal variation in disseminated neoplasia parameters, based on diagnosis by flow cytometry: prevalence, distribution (%) of the cockles among three disease intensity stages (excluded stage 0), and mean intensity ( $\pm$  standard error) of each sampling date. The seawater temperature ( $T^{\circ}\text{C}$ ) at sampling date is also indicated. Superscript letters indicate significantly-different disease mean intensities ( $p < 0.05$ ).

Date	Number of cockles	% of diseased animals	Among diseased animals			Disease intensity	T °C	
			% Stage 1	% Stage 2	% Stage 3			
2007-02-22	150	5.3%	37.5%	–	62.5%	64.5% <sup>ab</sup>	±13.6%	9.0
2007-04-11	68	10.3%	71.4%	14.3%	14.3%	44.4% <sup>bcd</sup>	±9.9%	12.5
2007-05-08	132	13.6%	50.0%	16.7%	33.3%	55.8% <sup>bc</sup>	±7.8%	15.0
2007-06-22	135	2.2%	100.0%	–	–	18.7% <sup>d</sup>	±2.0%	16.5
2007-07-21	145	6.9%	70.0%	20.0%	10.0%	38.1% <sup>cd</sup>	±6.7%	22.0
2007-09-11	173	3.5%	–	–	100.0%	95.5% <sup>a</sup>	±1.0%	21.0
2007-10-23	177	9.0%	75.0%	6.3%	18.8%	42.5% <sup>bcd</sup>	±8.0%	19.0
2007-12-15	182	4.4%	87.5%	12.5%	–	30.7% <sup>d</sup>	±6.3%	13.0
2008-02-20	74	10.8%	87.5%	–	12.5%	39.3% <sup>bcd</sup>	±6.9%	10.0

Two other high intensity values were observed in February and May 2007 ( $65.4\% \pm 13.6\%$  and  $55.8\% \pm 7.8\%$ , respectively). There was no significant relationship between mean disease intensity and disease prevalence ( $p > 0.05$ ), nor between mean disease intensity and seawater temperature ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Disseminated neoplasia and cockle position in sediment

Percentages of diseased animals were significantly different between buried and non-buried cockles ( $\text{Chi}^2 = 4.89$ ;  $\text{ddl} = 1$ ;  $p < 0.05$ ) (Table 2). Within diseased individuals, distribution be-



**Table 2**

Impact of cockle position in sediment on disseminated neoplasia parameters, based on diagnosis by flow cytometry: prevalence, distribution (%) of the cockles among three disease intensity stages (excluded stage 0), and mean intensity ( $\pm$  standard error). Superscript letters indicate significantly-different disease mean intensities ( $p < 0.05$ ).

Cockle position in sediment	Number of cockles	% of diseased animals	Among diseased animals			Disease intensity
			% Stage 1	% Stage 2	% Stage 3	
Buried	270	6.7%	83.3%	–	16.7%	40.6% <sup>a</sup> $\pm 5.9$
Unburied	406	11.8%	47.9%	6.3%	45.8%	53.0% <sup>b</sup> $\pm 5.1$

tween the three intensity stages was also significantly different according to cockle position in the sediment ( $\chi^2 = 4.73$ ;  $ddl = 1$ ;  $p < 0.05$ ). Only 16.7% of buried, diseased cockles were at stage 3; whereas, 45.8% of unburied, diseased cockles were at stage 3. Consequently, mean disease intensity of unburied cockles ( $53.0\% \pm 5.1$ ) was significantly higher than that of buried cockles ( $40.6\% \pm 5.9$ ) ( $p < 0.05$ ).

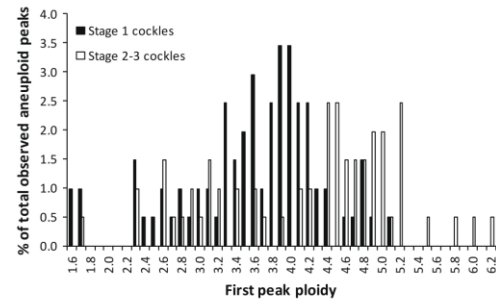
#### 3.4. Aneuploidy patterns

FCM histogram plots from diseased cockles could show one or more aneuploid peaks. These aneuploid peaks were labeled as the 1st, 2nd and 3rd aneuploid peak according to ploidy in an ascending manner. Of 143 neoplastic cockles analyzed by FCM, 86 (60.1%) showed only one aneuploid peak, 51 (35.7%) had two aneuploid peaks, and 6 (4.2%) showed three aneuploid peaks. The number of aneuploid peaks observed was not linked to mean disease intensity (percentage of neoplastic cells or intensity stages;  $p > 0.05$ ).

The proportion of one peak among all aneuploid peaks was determined as a function of position. When two aneuploid peaks coexist, the percentage of the cells in the 1st peak was significantly higher than the one in the 2nd ( $63.1\% \pm 3.9\%$  vs.  $35.9\% \pm 3.9\%$ ,  $p < 0.05$ ). The same pattern was observed in the case of three aneuploid peaks, where the 1st peak had a significantly higher percentage than both 2nd and 3rd, with the 2nd peak significantly higher than the 3rd ( $61.3\% \pm 10.4\%$ ,  $29.5\% \pm 7.9\%$  and  $9.2\% \pm 3.6\%$ , for 1st, 2nd, and 3rd peaks, respectively).

The ploidy values observed were partial values (not rounded) that ranged from  $1.6n$  to  $6.2n$  for the 1st aneuploid peak, from  $3.1n$  to  $9.6n$  for the 2nd aneuploid peak, and from  $3.9n$  to  $6.3n$  for the 3rd aneuploid peak. The overall mean ploidy of neoplastic cells was  $4.06n \pm 0.07$  ( $n = 143$ ). The distribution of the ploidy of neoplastic cells, from all the diseased cockles grouped together, using  $0.1n$  steps, did not fit a normal pattern ( $W = 0.92$ ,  $p < 0.05$ ) nor a uniform distribution ( $\chi^2 = 258.1$ ;  $ddl = 17$ ;  $p < 0.05$ ). Ploidy distribution appeared to be multimodal.

To explore whether or not the DNA content of the 1st aneuploid peak provides a particular pattern according to the development of the disease, ploidy distributions were plotted separately for lightly-diseased animals (stage 1) and for moderately-highly-diseased individuals (stages 2–3) (Fig. 3). The 1st aneuploid peak mean ploidy was significantly higher in stage 2–3 cockles than in stage 1 cockles ( $4.2n \pm 0.1$  vs.  $3.6n \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ). Distribution of the 1st aneuploid peak ploidy of stage 1 cockles appeared as a unique mode with similar median and mean of  $3.7n$  and  $3.6n$ , respectively. At stages 2 and 3, the distribution of the 1st aneuploid peak ploidy had two modes. Median values of first and second modes were  $3.0n$  and  $4.7n$ , and mean values of the same modes were  $2.9n$  and  $4.8n$ , respectively. Similar median and mean values are characteristics of symmetric distributions. Aneuploidy mean val-



**Fig. 3.** Distribution of the ploidy of the 1st aneuploid peak for stage 1 cockles and stage 2 + stage 3 cockles. Data are expressed in % of the total observed aneuploid peaks ( $n = 206$ ).

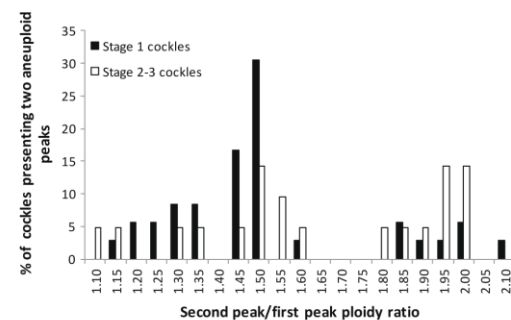
ues and patterns were not affected by season or cockle position in sediment for any of the disease stages.

Considering the 57 neoplastic cockles with more than one aneuploid peak, the distribution of the ratio between the ploidy of one aneuploid peak and preceding one did not show a clear pattern. This distribution did not fit a normal pattern ( $W = 0.91$ ,  $p = 0.05$ ) nor a uniform one ( $\chi^2 = 41.7$ ;  $ddl = 3$ ;  $p < 0.05$ ). Values ranged from 1.10 to 2.35, and this ratio was lower than 2.00 in 88.9% of the cases. Distribution of this ploidy ratio between 2nd and 1st peaks, however, differed according to disease stages (stage 1 vs stages 2–3) (Fig. 4). At stage 1, this ratio had a unique mode near 1.50 (47.2% of the cases were between 1.42 and 1.52); whereas, at stages 2 and 3 there were 2 modes near 1.5 and 2.0 (33.3% between 1.42 and 1.57% and 28.6% of the cases between 1.92 and 2.02, respectively).

#### 4. Discussion

##### 4.1. Evidence of disseminated neoplasia and diagnosis issues

The presence of neoplastic cells in hemolymph and organs of cockles from Arcachon Bay was confirmed by hemolymph cell-monolayers and histological sections as well as by FCM. Additionally, a progressive and proliferative pattern of the phenomenon was observed. This supports the hypothesis of a single cell line and its propagation from hemolymph into the organs. Loss of organ



**Fig. 4.** Distribution of the ratio between the ploidy of the 2nd and the 1st aneuploid peaks for stage 1 and stage 2–3 cockles. Data are expressed, for stage 1 and stage 2–3 cockles, in % of stage 1 cockles ( $n = 36$ ) and in % of stage 2–3 cockles ( $n = 21$ ) showing two aneuploid peaks, respectively.

tissues architecture was also observed, as previously described by Villalba et al. (2001). At the early stages of the disease development, only the gills and the visceral mass + gonad were invaded; whereas, in advanced stages of the disease, muscle and foot were also invaded (data not shown). The same progression was observed in mussels from Oregon (Mix, 1983), in cockles from Galicia (Iglesias, 2006), and in soft-shell clams from Prince Edward Island (Abo-Elkhair et al., 2009b). FCM studies revealed major DNA disorders, most often hyperploidy, in diseased cockles. Thus, cytological, histological and flow-cytometric characteristics of neoplastic cells described here demonstrate that cockles from Arcachon Bay are affected by DN.

Difficulties of the FCM diagnostic method reside in the determination of a limit between healthy and lightly-diseased individuals (as for any disease diagnosis), using percentage of aneuploid cells and ploidy values. Indeed, as natural replication of the DNA can occur during mitosis, healthy cockles always contain a low proportion of tetraploid cells. The problem is, thus, to differentiate cells in division ( $2 \times 2n$ ) from neoplastic cells ( $4n$ ). Reno et al. (1994) observed that non-diseased clams *Mya arenaria* from the USA have approximately 6% of circulating cells being aneuploid. Delaporte et al. (2008) found that under 5% of aneuploid cells, *M. arenaria* from Canada was considered to be healthy and above 20% as diseased. In the present study, the 15% limit of  $3.5n$ – $4.5n$  cells, between healthy and lightly-diseased cockles, was set using a statistical analysis of tetraploid cell percentage distribution. This statistical method appeared as a good compromise, easily applicable for an annual survey. Using this limit, diagnosis of DN made by light microscopy and FCM were in very good agreement. Nevertheless, such an approach remains empirical and has unavoidable limitation in application. Occurrence of false negative or positive diagnoses of lightly-diseased individuals cannot be excluded as normal cell-division rate is expected to vary seasonally. Finally, as the limit between healthy and diseased *M. arenaria* appeared to differ among species and sites (Reno et al., 1994; Delaporte et al., 2008), the use of light microscopy methods is unavoidable to calibrate the FCM diagnostic method for each bivalve stock.

## 4.2. Evaluation of disseminated neoplasia seasonality

DN was present all year long in cockles of Arcachon Bay, indicating that the disease is endemic in this area. Prevalences in Arcachon Bay were low (13.6% maximum) compared to prevalence in cockle stocks from Ireland (up to 60%) (Twomey and Mulcahy, 1988) and Galicia (up to 84%) (Villalba et al., 2001), but in the range of prevalence in the same species in Carantec (2–9%) (Poder and Auffret, 1986).

Seasonal variation in DN prevalence was not related to water temperature. Prevalence displayed unexplained episodic peaks. Previous observations in Ireland showed that DN prevalence was highest in early summer and autumn in *Cerastoderma edule* (Twomey and Mulcahy, 1988). In *M. arenaria*, most authors reported that prevalences varied through the year, but with variations among years and sites, with no clear relationship between prevalence and season (Farley et al., 1986, 1991; Brousseau, 1987; Barber, 1990; Leavitt et al., 1990; Weinberg et al., 1997). In Arcachon Bay, disease intensity was observed to vary through the year from 19% to 96%, but it was not linked with sea water temperature. Three peaks of higher intensities were observed in February, May and September 2007, followed by lower intensities. These decreases could be the consequence of a remission phenomenon, but more likely attributable to the death of highly-diseased animals. Indeed, in *M. arenaria* and *Mytilus edulis*, remission was possible, but most often DN led to death (Elston et al., 1988; Barber, 1990; Brousseau and Baglivo, 1991). Most diseased cockles from Arcachon Bay were lightly- (stage 1) or highly- (stage 3) diseased but

intermediate stages (stage 2) were quite rare. This suggests sudden and rapid progression from early to severe stages. It appears that cockles may be able to maintain stage 1, but when the disease progresses, cockles quickly reach stage 3, a stage at which they cannot survive very long. Indeed, when maintained in laboratory conditions, stage 3 cockles rarely survive more than two or three days; whereas, healthy cockles readily survive more than one month (data not shown).

## 4.3. Disseminated neoplasia and cockle position in the sediment

The observed higher proportion of diseased cockles in unburied samples was expected since similar patterns were described in other infaunal bivalve diseases such as Brown Ring Disease or Brown Muscle Disease in *Ruditapes philippinarum* (Paillard, 1992; Dang et al., 2008) and QPX in *Mercenaria mercenaria* (Smolowitz et al., 1998). In cockles, this rise to the surface is considered as a prelude to death since 20–100% of these individuals died within 7 days (Desclaux et al., 2002), and can be attributed to: (1) wide temperature variations (Lauckner, 1987), (2) crowding (Richardson et al., 1993), and (3) cockles that are weakened by some physiological stress, including disease. At Banc d'Arguin, the first two hypotheses can be discounted because daily temperature was rather stable, and cockle abundance was low. Previous studies have attempted to clarify the mechanisms by which cockles appeared at the surface of the sediment but they still remain unclear. Indeed, neither digenean trematode parasites nor bacterial load could fully account for this phenomenon (Desclaux et al., 2002; Blanchet et al., 2003). Similarly, Brown Muscle Disease did not totally explained *R. philippinarum* rise to the sediment surface (Dang and Montaudouin, 2009). Thus, the present study evidenced for the first time that, along with the previously cited diseases, DN could also be responsible of cockle migration to the surface of the sediment.

## 4.4. Aneuploid patterns

Previous FCM studies reported that *M. arenaria* neoplastic cells from both Eastern USA and Canada were  $4n$  (Reno et al., 1994; Delaporte et al., 2008) and that mussels neoplastic cells from Washington State were either  $4n$  or  $5n$  (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991). In the present study, such a clear pattern with tetra-, or pentaploid cells was not observed, but rather a ploidy continuum. To the best of our knowledge, this is the first report of such a pattern related to DN. However, it is difficult to assess if this ploidy continuum is a particularity of cockles from Arcachon Bay or if it is common in all cockles affected by DN. In Galician cockles, number of analyzed neoplastic individuals was too low to state about ploidy distribution (da Silva et al., 2005). In Ireland, DNA content of diseased cockles were grouped around various rounded and half-rounded values:  $1.5n$ ,  $2.5n$ ;  $3n$ ;  $4n$ ;  $5n$  and  $6n$  (Collins, 1998). Although such a broad ploidy distribution resemble this observed in Arcachon, it is yet impossible, without reprocessing FCM data, to state whether neoplastic cockles in Ireland would reveal a ploidy continuum similar to cockles in Arcachon Bay.

Mechanisms leading to the different aneuploid forms in Arcachon Bay cockles seemed complex and difficult to understand. Interestingly, irrespective of the seawater temperature and of the cockle position in sediment, 1st aneuploid peak ploidy was found to increase as the disease progressed. Moreover, the distribution pattern of the 1st peak ploidy was different depending on the disease intensity. This suggests that mechanisms leading to the formation of neoplastic cells develop or change as the disease progresses. Such links were not reported by Reno et al. (1994). Also, Delaporte et al. (2008) observed a unique ploidy level of  $4n$  in *M. arenaria*, irrespective of the stage of disease development.

Coexistence of two or three aneuploid peaks within one individual was observed in 40% of the neoplastic cockles analyzed. Such a phenomenon was also observed in cockles (Collins, 1998; da Silva et al., 2005) and mussels (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991). Elston et al. (1990) suggested that cells in the 2nd peak correspond to neoplastic cells undergoing mitosis as the ratio between the second and first peaks is often close to 2.0. In our study, <15% of samples had a ratio near 2.0. This suggests that mitosis is not the main mechanism leading to the formation of several aneuploid peaks in these cockles. Two other hypotheses can be proposed: (1) the presence of two concomitant neoplasia mechanisms developing within a single individual, each mechanism leading to a unique but different ploidy peak, or (2) altered cell-division mechanism, loss of chromosomes for instance, of neoplastic cells undergoing mitosis. Moore et al. (1991) propose that penta- and tetraploid forms of DN may result from different specific, independent chromosomal aberrations, as reported for many mammalian leukemias and lymphomas (Solomon et al., 1991). Considering this hypothesis, the number of aberrations would be greater in DN of cockles from Arcachon Bay than in others described to date. Moreover, this ratio changed through disease development. Stage 1 cockles mainly displayed a ploidy ratio between the 1st and the 2nd aneuploid peaks of 1.5, but stage 2–3 cockles displayed mainly ratios of 1.5 and 2.0. This suggests that, if the 2nd peak is a division product of the 1st peak, two different mechanisms of altered cell-division may lead to the formation of the 2nd peak, depending upon disease development.

Chromosomal aberrations leading to DNA aneuploidy are generally the result of a problem in DNA multiplication and/or cell-division processes. The most common types of these anomalies are: (i) the presence of supernumerary chromosomes, (ii) the presence of one or several entire extra sets of the normal DNA, (iii) chromosomal-band deletions or duplication, or (iv) chromosomal fragments lagging during mitosis (Pelman, 2007). In the present study, most of the cell ploidy observed in hemolymph cockles was not exactly tetra-, penta- or triploid, but rather a wide range of ploidy values. The second case of polyploidy, therefore, appears unlikely to be the mechanism involved. One or more of the other three mechanisms could be exacerbated in Arcachon Bay cockles, leading to such a broad ploidy distribution. Karyotyping studies have reported the presence of supernumerary chromosomes in cockle cells from Galicia and Portugal (Insua and Thiriot-Quievreux, 1992; Leitao et al., 2008). Leitao et al. (2008) suggested a fission event. In a similar manner, karyological analysis of *Mytilus* neoplastic cells demonstrated that the 5n ploidy resulted from extensive chromosomal fragmentation (Elston et al., 1992). Moreover, Reno et al. (1994) observed changes in chromosome shape in *M. arenaria*, which may indicate chromosomal breakage. These fission events would occur at specific, fragile sites along the chromosome, called “hotspots”. A higher frequency of “hotspots” on cockle chromosomes than in other species could explain the observed ploidy distribution. All these anomalies of cell-division processes can be attributable to a dysfunction of the proteins controlling mitotic check points. A possible retroviral etiology of DN could be associated with this hypothesis. Indeed, the integration of retroviral genes into the host genome is an established basis of neoplastic transformation in vertebrates (Burny et al., 1988; Varmus, 1988) and can result in dysregulation of normal cell-division.

## 5. Conclusion

This study presents the first evidence of DN occurrence in the cockle, *C. edule*, in the south of France. Our observations represent a new case report of tumors in French bivalve mollusks and extend the geographic range of marine bivalve mollusks affected by DN.

Contrary to Galician cockle populations, no mass mortality of cockles has yet been reported in Arcachon Bay. The higher DN prevalence and intensity in unburied than in normally-buried cockles is an ecological characteristic of the disease that has not been reported previously. Ploidy distribution of diseased cockles from Arcachon Bay appeared to follow a unique pattern. A continuum of partial ploidy values was observed in the present study and differed from rounded values reported in previous studies. Although it is not yet possible to clearly assess which mechanisms would lead to such a wide range of ploidy, in-depth cytogenetic approaches would certainly contribute to unveil these mechanisms.

## Acknowledgments

The authors would like to thanks Dr. Paul Else (University of Wollongong, Australia) and Dr. Gary Wikfors (NOAA, Milford, USA) for English revisions and comments. This work was supported by a grant from Région Bretagne to Fabienne Le Grand and by the project Multistress (Coord.: X. de Montaudouin) of the French National Research Agency (ANR).

## References

- AboElkhair, M., Siah, A., Clark, K.F., McKenna, P., Pariseau, J., Greenwood, S.J., Berthe, F.C.J., Cepica, A., 2009a. Reverse transcriptase activity associated with haemic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. Dis. Aquat. Organ. 84, 57–63.
- AboElkhair, M., Synard, S., Siah, A., Pariseau, J., Davidson, J., Johnson, G., Greenwood, S.J., Casey, J.W., Berthe, F.C.J., Cepica, A., 2009b. Reverse transcriptase activity in tissues of the soft shell clam *Mya arenaria* affected with haemic neoplasia. J. Invertebr. Pathol. 102, 133–140.
- Auffret, M., Poder, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II: electron microscopical study. Aquaculture 58, 9–15.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol. 12, 549–559.
- Barber, B.J., 1990. Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft shell clams, *Mya arenaria*, from the Shrewsbury River, New Jersey. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 377–386.
- Barber, B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. Aquat. Living. Resour. 17, 449–466.
- Blanchet, H., Raymond, N., de Montaudouin, X., Capdepuy, M., Bachelet, G., 2003. Effects of digenetic trematodes and heterotrophic bacteria on mortality and burying capability of the common cockle *Cerastoderma edule* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 293, 89–105.
- Brousseau, D.J., 1987. Seasonal aspects of sarcomatous neoplasia in *Mya arenaria* (soft-shell clam) from Long Island Sound. J. Invertebr. Pathol. 50, 269–276.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A., 1991. Disease progression and mortality in neoplastic *Mya arenaria* in the field. Mar. Biol. 110, 249–252.
- Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van den Broeke, A., Willems, L., Thomas, R., 1988. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Vet. Microbiol. 17, 197–218.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). J. Invertebr. Pathol. 78, 87–97.
- Collins, C., 1998. Studies on a Neoplasm of the Cockle, *Cerastoderma edule* (Linnaeus). Ph. D. Thesis Dissertation, National University of Ireland, Cork, pp. 155.
- Collins, C.M., Mulcahy, M.F., 2003. Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. Dis. Aquat. Organ. 54, 61–67.
- Cooper, K.R., Brown, R.S., Chang, P.W., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. J. Invertebr. Pathol. 39, 149–157.
- da Silva, P.M., Soudant, P., Carballal, M.J., Lambert, C., Villalba, A., 2005. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. Dis. Aquat. Organ. 67, 133–139.
- Dang, C., Montaudouin, X., 2009. Brown muscle disease and Manila clam *Ruditapes philippinarum* dynamics in Arcachon Bay, France. J. Shellfish Res. 28, 355–362.
- Dang, C., De Montaudouin, X., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Caill-Milly, N., 2008. Brown muscle disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Arcachon Bay (SW France). Dis. Aquat. Organ. 80, 219–228.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Jacobberger, J.W., 2004. Cytometry of the cell cycle: cycling through history. Cytometry 58, 21–32.
- Delaporte, M., Synard, S., Pariseau, J., McKenna, P., Tremblay, R., Davidson, J., Berthe, F.C.J., 2008. Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry. J. Invertebr. Pathol. 98, 190–197.



- Desclaux, C., de Montaudouin, X., Bachelet, G., 2002. Cockle emergence at the sediment surface: favourization mechanism by digenean parasites? *Dis. Aquat. Organ.* 52, 137–149.
- Dungan, C.F., Hamilton, R.M., Hudson, K.L., McCollough, C.B., Reece, K.S., 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Dis. Aquat. Organ.* 50, 67–78.
- Elston, R.A., Kent, M.L., Drum, A.S., 1988. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 4, 135–142.
- Elston, R.A., Drum, A.S., Allen, S.K., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Organ.* 8, 51–59.
- Elston, R.A., Moore, J.D., Brooks, K., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Rev. Aquat. Sci.* 6, 449–466.
- Farley, C.A., 1969a. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31, 541–555.
- Farley, C.A., 1969b. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 509–516.
- Farley, C.A., 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve molluscs. *Prog. Exp. Tumor. Res.* 20, 283–294.
- Farley, C.A., Otto, S.V., Reinisch, C.L., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, *Mya arenaria*. *Fish. Bull.* 84, 851–857.
- Farley, C.A., Plutschak, D.L., Scott, R.F., 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma in Maryland softshell clams, *Mya arenaria*, 1984–1988. *Environ. Health Perspec.* 90, 35–41.
- House, M.L., Kim, C.H., Reno, P.W., 1998. Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 187–192.
- Howard, D.W., Smith, C.S., 1983. Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks NOAA Tech. Memo. US Department of Commerce NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, MA, pp. 97.
- Iglesias, D., 2006. Estudio Patológico de las Poblaciones de Berberecho *Cerastoderma edule* (L) de Galicia. Ph. D. Thesis Dissertation, Universidade de Santiago de Compostela, pp. 266.
- Insua, A., Thiriot-Quiévreux, C., 1992. Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquat. Living. Resour.* 5, 1–8.
- Krishan, A., 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell. Biol.* 66, 188–193.
- Lauckner, G., 1987. Ecological effects of larval trematode infestation on littoral marine invertebrate populations. *Int. J. Parasitol.* 17, 391–398.
- Leavitt, D.F., McDowell Capuzzo, J., Smolowitz, R.M., Miosky, D.L., Lancaster, B.A., Reinisch, C.L., 1990. Hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: prevalence and indices of physiological condition. *Mar. Biol.* 105, 313–321.
- Leitao, A., Chaves, R., Joaquim, S., Matias, D., Ruano, F., Guedes-Pinto, H., 2008. Supernumerary chromosomes on Southern European populations of the cockle *Cerastoderma edule*: consequence of environmental pollution? *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 79, 152–156.
- McGladery, S.E., Reinisch, C.L., MacCallum, G.S., Stephens, R.E., Walker, C.L., Davidson, J.T., 2001. Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 101, 19–26.
- Mix, M.C., 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *J. Fish. Dis.* 6, 239–248.
- Mix, M.C., Hawkes, J.W., Sparks, A.K., 1979. Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. *J. Invertebr. Pathol.* 34, 41–56.
- Moore, J.D., Elston, R.A., Drum, A.S., Wilkinson, M.T., 1991. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 231–243.
- Oprandy, J.J., Chang, P.W., 1983. 5-bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 196–206.
- Oprandy, J.J., Chang, P.W., Pronovost, A.D., Cooper, K.R., Brown, R.S., Yates, V.J., 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 38, 45–51.
- Ordas, M.C., Figueras, A., 2005. Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (*Cerastoderma edule*) in Carril (Galicia, NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 25, 124–130.
- Paillard, C., 1992. Etiologie et Caractérisation de la Maladie de L'anneau Brun Chez la Palourde D'élevage *Ruditapes philippinarum*. Ph. D. Thesis Dissertation, Université de Brest, pp. 196.
- Pellman, D., 2007. Cell biology: aneuploidy and cancer. *Nature* 446, 38–39.
- Peters, E.C., 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 74–92.
- Poder, M., Auffret, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. I. Morphology and population survey in Brittany, France. *Aquaculture* 58, 1–8.
- Reno, P.W., House, M., Illingworth, A., 1994. Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 163–172.
- Richardson, C.A., Ibarrola, I., Ingham, R.J., 1993. Emergence pattern and spatial distribution of the common cockle *Cerastoderma edule*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 99, 71–81.
- Rodriguez, H., Soto, M., Arias, C., Estevez, J., 1997. A case of disseminated haemic sarcoma in *Cerastoderma (=Cardium) glaucum* (Poir., 1789) collected from Ria de Vigo (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 17, 88–90.
- Romalde, J.L., Luz Vilarinho, M., Beaz, R., Rodriguez, J.M., Diaz, S., Villalba, A., Carballal, M.J., 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 95–101.
- Smolarz, K., Renault, T., Soletchnik, P., Wolowicz, M., 2005. Neoplasia detection in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk: comparison of flow cytometry, histology and chromosome analysis. *Dis. Aquat. Organ.* 65, 187–195.
- Smolowitz, R., Leavitt, D., Perkins, F., 1998. Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (Hard Clams) from the coast of Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 9–25.
- Solomon, E., Borrow, J., Goddard, A.D., 1991. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153–1160.
- Sunila, I., 1994. Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. In: Rosenfield, A., Kern, F.G., Keller, B.J. (Eds.), *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. US Department of Commerce, Woods Hole, MA, pp. 11–13.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1984. A proliferative disorder of possible hemic origin in the common cockle, *Cerastoderma edule*. *J. Invertebr. Pathol.* 44, 109–111.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988. Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Organ.* 5, 225–238.
- Valet, G., 2003. Past and present concepts in flow cytometry: a european perspective. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 17, 213–222.
- Varmus, H., 1988. Retroviruses. *Science* 240, 1427–1435.
- Villalba, A., Carballal, M.J., Lopez, C., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.* 46, 213–216.
- Walker, C., Bottger, S.A., Mulkern, J., Jerszyk, E., Litvaitis, M., Lesser, M., 2009. Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: applications for human and animal disease and environmental health. *Biol. Bull.* 216, 23–39.
- Weinberg, J.R., Leavitt, D.F., Lancaster, B.A., Capuzzo, J.M.D., 1997. Experimental field studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the induction and effect of hematopoietic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 183–194.

### 3 CARACTERISTIQUES DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE CHEZ LA MYE *MYA ARENARIA* DE L'ILE DU PRINCE EDOUARD (CANADA)

La néoplasie disséminée affectant la mye *Mya arenaria* de l'île du Prince Edouard, site de North River (Canada) a été étudiée. Des paramètres généraux tels que la prévalence et l'intensité de cette pathologie ont été déterminés. D'autres caractéristiques plus spécifiques telles que les évolutions de concentration, de morphologie et de ploïdie des cellules de l'hémolymphes en fonction du stade de développement de la maladie ont également été analysées.

#### 3.1 RESULTATS

##### 3.1.1 PRÉVALENCES ET INTENSITÉ

En mai 2008, l'hémolymphes de 300 myes a été prélevée afin de diagnostiquer la présence de néoplasie disséminée chez ces animaux, selon la méthode d'analyse du contenu en ADN des cellules circulantes de l'hémolymphes par cytométrie de flux. Les critères utilisés pour distinguer les individus malades des individus sains ont été ceux décrits par Delaporte et al. (2008) : les individus sains présentent moins de 5% de cellules aneuploïdes tandis que les individus malades présentent plus de 20% de cellules aneuploïdes. Pour les individus présentant entre 5% et 20% de cellules aneuploïdes dans leur hémolymphes, le diagnostic est considéré comme indéterminé. Parmi les individus atteints de néoplasie disséminée, trois stades de développement de la maladie ont été différenciés :

- Stade 1 : entre 20 et 50% de cellules aneuploïdes dans l'hémolymphes
- Stade 2 : entre 50 et 75% de cellules aneuploïdes dans l'hémolymphes

- Stade 3 : plus de 75% de cellules aneuploïdes dans l'hémolymphe

Parmi les 300 animaux diagnostiqués, 68.9% des myes étaient saines et 19.9% étaient atteintes de néoplasie disséminée. Pour les 11.2% restantes, aucun diagnostic précis n'a pu être établi (Figure 44). Les myes néoplasiques se répartissaient relativement assez régulièrement entre les différents stades de développement de la maladie avec 43.4% de stade 1, 33.3% de stade 2 et 23.3% de stade 3. L'intensité de la pathologie, c'est-à-dire le pourcentage moyen de cellules aneuploïdes dans l'hémolymphe des individus diagnostiqués comme néoplasiques était de  $53.7\% \pm 4.0\%$ .

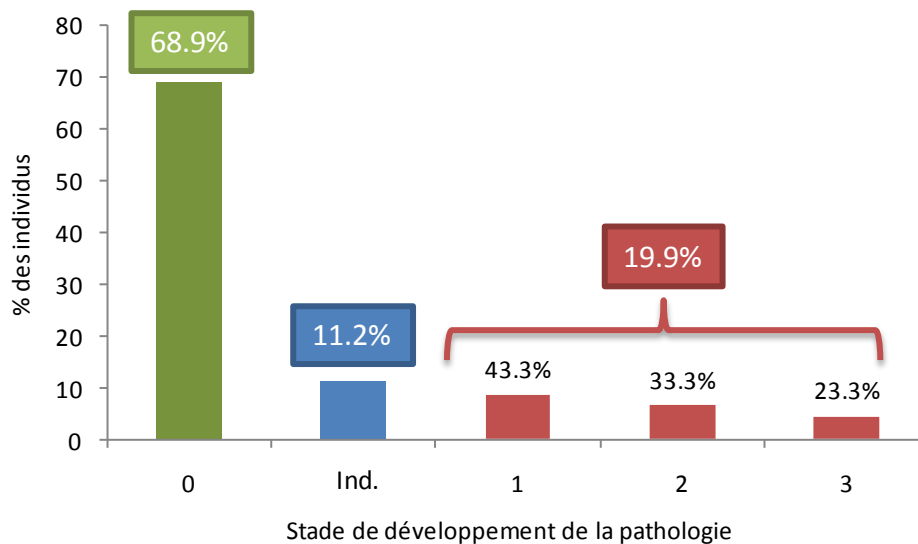


Figure 44 : Distribution des myes en fonction du stade de développement de la néoplasie disséminée : saines (stade 0), légèrement malades (stade 1), modérément malades (stade 2) ou très malades (stade 3). Pour certains individus, aucun diagnostic précis n'a pu être établi (stade indéterminé, noté Ind.).

### 3.1.2 CONCENTRATION ET MORPHOLOGIE DES CELLULES ANEUPLOIDES

Les concentrations des cellules dans les pools d'hémolymphe de myes étaient en moyenne de  $0.5 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans des myes saines (stade 0) et de  $1.0 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans des myes très malades (stade 3) mais n'étaient pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ) (Figure 45).

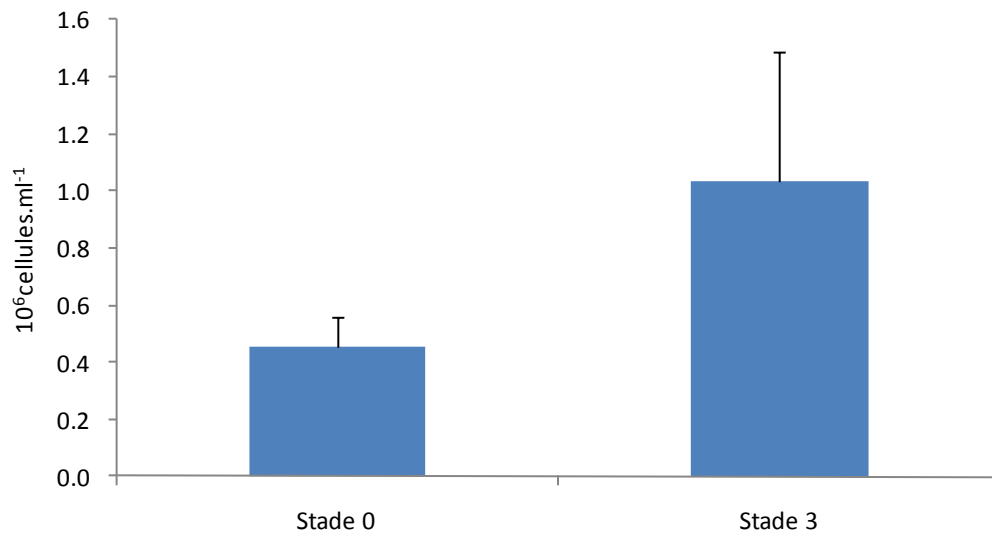


Figure 45: Concentrations cellulaires ( $10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) dans des pools d'hémolymphe de mye *Mya arenaria* en fonction du stade de développement de la néoplasie disséminée : pools d'individus sains (stade 0) et pools d'individus très malades (stade 3).

La morphologie des hémocytes et des cellules néoplasiques a été étudiée. Comme illustré par la Figure 46, ces deux types de cellules peuvent se distinguer par cytométrie de flux en fonction de leur taille relative (paramètre « forward scatter », FSC) et de leur complexité relative (paramètre « side scatter », SSC). En effet, les valeurs de ces deux paramètres, exprimées en unités arbitraires, sont significativement plus élevées pour les cellules néoplasiques (en bleu) que pour les hémocytes (en vert) ( $p < 0.01$ ). Les valeurs étaient de  $150.4 \pm 1.8$  et  $84.9 \pm 1.7$  pour le FSC et de  $36.9 \pm 0.6$  et  $25.8 \pm 0.8$  pour le SSC, respectivement.



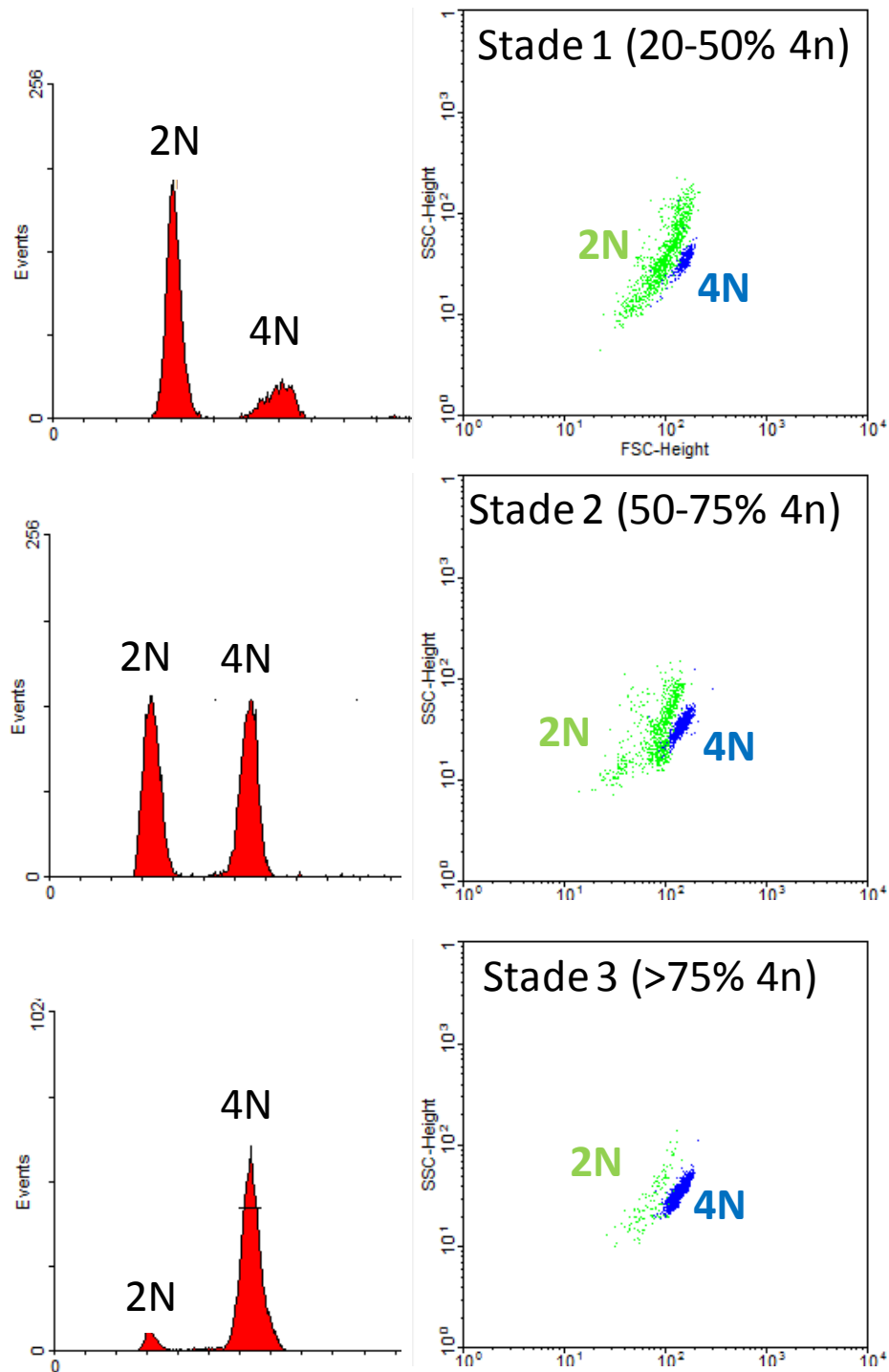


Figure 46: Exemples de cytogrammes obtenus par cytométrie en flux de cellules d'hémolymphes de myes *Mya arenaria* atteintes de néoplasie disséminée. Les pics représentent la distribution des cellules en fonction de leur contenu en ADN. Deux pics sont détectables : celui correspondant à une ploïdie de 2n, représentant les hémocytes normaux, et celui correspondant à une ploïdie de 4n, représentant les cellules néoplasiques. Différents stades de développement de la pathologie sont représentés. Ils se différencient par la proportion de cellules 4n dans l'hémolymphes : stade 1 (de 20% à 50%), stade 2 (de 50% à 75%) et stade 3 (plus de 75%). Pour chaque exemple, les nuages de points correspondent à la distribution en termes de « forward scatter » (FSC, taille relative) et de « side scatter » (SSC, complexité relative) des hémocytes 2n (en vert) et des cellules néoplasiques 4n (en bleu).

### 3.1.3 PLOÏDIE DES CELLULES ANEUPLOÏDES

Pour un échantillon d'hémolymphé considéré, toutes les cellules aneuploïdes présentaient une seule et même ploïdie. Seulement dans de rares cas, un 2<sup>ème</sup> pic aneuploïde, présentant une aire très faible à la limite du détectable, a pu être observé aux environs de 8n. Sur toutes les myes néoplasiques diagnostiquées, la distribution de la ploïdie des cellules aneuploïdes variait de 3.6n à 4.5n, avec une moyenne et une médiane présentant une valeur de 4.0n. Les distributions de ces valeurs, en séparant les individus peu malades (stade 1) de ceux modérément à très malades (stades 2 et 3) présentaient de fortes similitudes (Figure 47). En effet, les moyennes et médianes de ces distributions étaient égales (4.0n) quel que soit le stade considéré. Ceci est également illustré par les trois exemples de la Figure 46 : quel que soit le stade de développement de la néoplasie disséminée, les cellules aneuploïdes présentent une ploïdie de 4n.

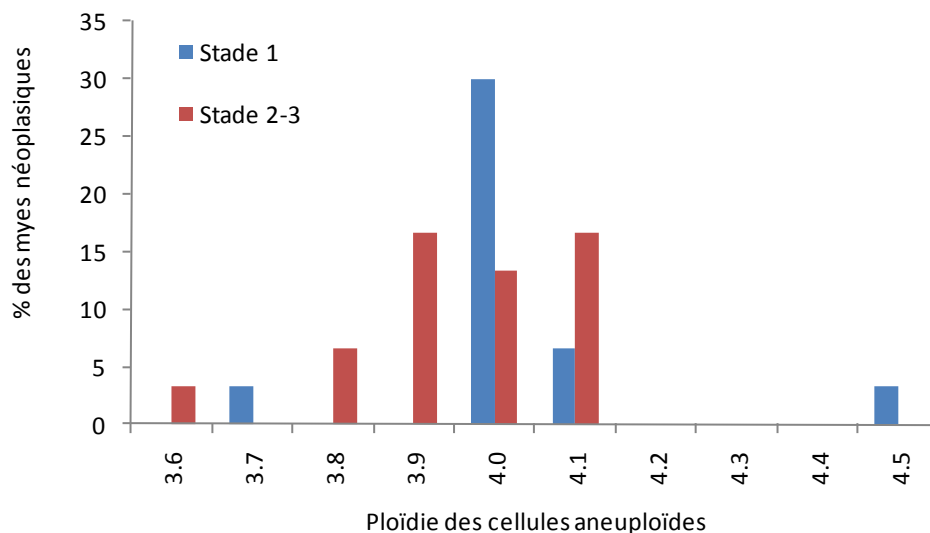


Figure 47: Distribution de la ploïdie des cellules aneuploïdes de myes néoplasiques en fonction de leur stade de développement de la maladie (stade 1 ou stade 2-3). Les données sont exprimées en pourcentage des individus néoplasiques (n = 60).

### 3.2 DISCUSSION

La néoplasie disséminée affectant la mye *Mya arenaria* de l'île du Prince Edouard (Canada) a été caractérisée en termes de prévalence, intensité, concentration cellulaire dans l'hémolymph, morphologie et ploïdie. La comparaison de ces données avec celles obtenues pour la coque *Cerastoderma edule* provenant du bassin d'Arcachon et atteintes de cette même maladie, a permis de mettre en évidence un grand nombre de différences (Le Grand et al., 2010).

La première différence entre les deux espèces réside dans la prévalence de la maladie. En effet, chez la mye de l'île du Prince Edouard, lors du point de prélèvement effectué en mai 2008, presque 20% des animaux étaient malades alors que cette prévalence n'a jamais dépassé 13.6% durant toute l'année 2007 pour les coques d'Arcachon, où elle était en moyenne de 7.3%. Dans le cas des myes, une prévalence similaire à celle décrite ici avait été également signalée par Delaporte et al. (2008) sur ce même site de « North River » (18%). McGladdery et al. (2001) ont néanmoins déjà indiqué des prévalences atteignant 95% chez cette espèce, sur l'île du Prince Edouard. Ainsi, même si les prévalences sont connues pour varier, notamment intra-annuellement chez la mye (Elston et al., 1992), il semble que la néoplasie disséminée puisse toucher une plus forte proportion d'individus chez la mye que chez la coque à Arcachon.

La répartition des animaux néoplasiques entre les trois stades de développement de la maladie apparaît comme une autre différence entre les deux espèces étudiées. En effet, chez la coque, tout au long du suivi saisonnier, en moyenne 64.3% des animaux malades étaient de stade 1 (<50% de cellules aneuploïdes), 27.9% de stade 3 (>75% des cellules aneuploïdes) mais seulement 7.7% de stade 2 (50-75% de cellules aneuploïdes). Chez la mye de l'île du prince Edouard le pourcentage d'individus de stade 2, parmi les individus malades, atteint 33.3% alors que chez les coques du bassin d'Arcachon, il n'a jamais dépassé 20%. Cela pourrait suggérer que la pathologie touchant les coques d'Arcachon est de type « fulgurant », contrairement à celle affectant les myes de l'île du Prince Edouard. En effet,

dans le bassin d'Arcachon, le faible pourcentage d'animaux de stade 2, c'est-à-dire modérément malades, pourrait s'expliquer par une progression extrêmement rapide de la pathologie, chez des coques ne pouvant plus contenir la maladie aux prémices du développement, vers un stade très avancé qui entraîne rapidement la mort. Au contraire, en ce qui concerne les myes de l'île du Prince Edouard, le pourcentage assez élevé d'individus de stade 2 laisse suggérer une évolution plus lente et progressive de la maladie (Figure 48). L'origine de cette différence dans la vitesse d'évolution de la pathologie peut être multiple. En effet, elle peut être le résultat (i) d'une capacité de résistance différente entre les deux espèces et/ou (ii) en considérant l'hypothèse d'une étiologie virale (House et al., 1998; Romalde et al., 2007; AboElkhair et al., 2009), d'un type de virus différent, et/ou (iii) de conditions environnementales particulières et ponctuelles favorisant ou non le développement de la maladie (Figure 49).

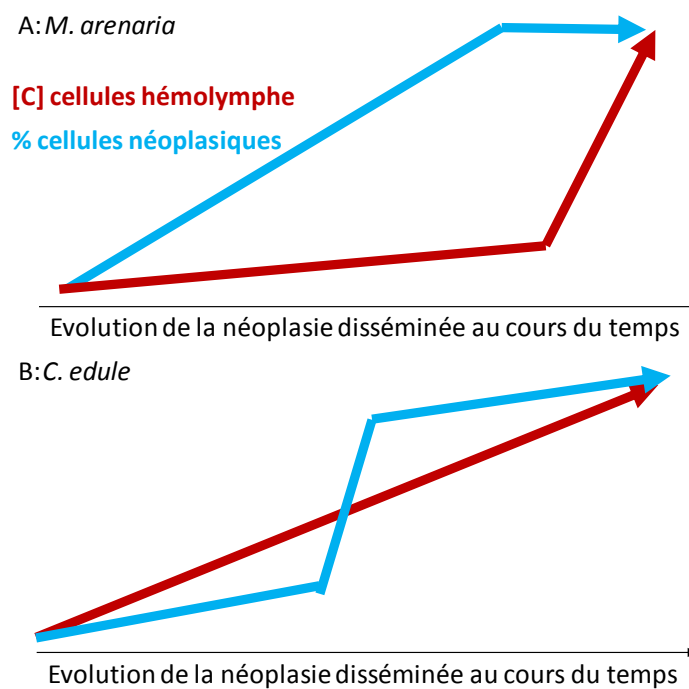


Figure 48: Schémas hypothétiques de l'évolution de la concentration des cellules de l'hémolymphe (en rouge) et de la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymphe (en bleu) en fonction du temps chez (A) la mye *Mya arenaria* de l'île du prince Edouard et chez (B) la coque *Cerastoderma edule* du bassin d'Arcachon (B), atteintes de néoplasie disséminée.

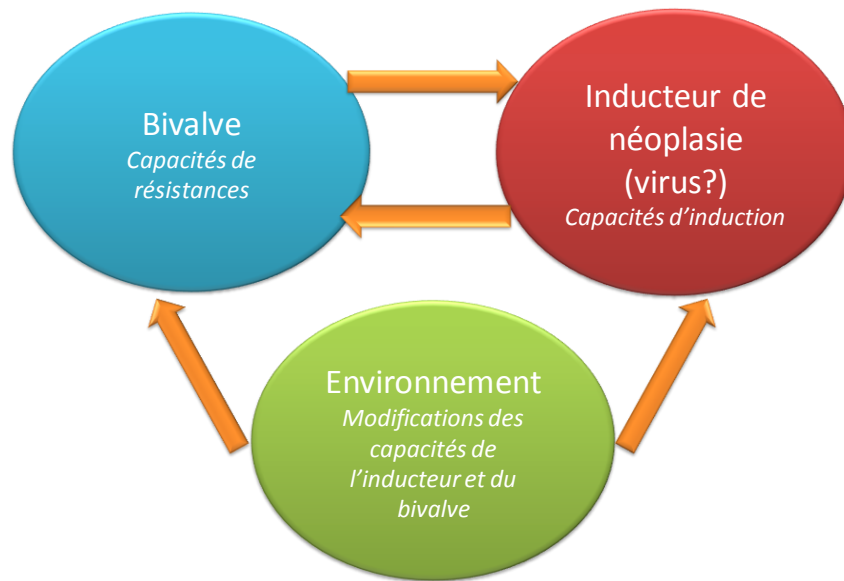


Figure 49: Schéma hypothétique représentant les différentes interactions possibles entre les éléments pouvant influencer sur l'induction et le développement de la néoplasie disséminée.

D'autre part, les concentrations cellulaires dans l'hémolymph de myes néoplasiques, quel que soit le stade de développement de la pathologie qu'elles présentaient, ne différaient pas significativement de celles observées chez des individus sains. En effet, la valeur de ce paramètre, calculée sur des pools de plus de 15 individus, est seulement deux fois plus élevée chez des individus très malades de stade 3 que chez des individus sains. Une tendance similaire a été également observée lors de l'analyse des cellules de l'hémolymph pour le diagnostic individuel de la néoplasie disséminée par cytométrie en flux (données non montrées). Ceci suggère une prolifération modérée des cellules néoplasiques. En général, la prolifération des cellules est le résultat d'une augmentation du taux de division des cellules néoplasiques (Mix, 1975). Dans le cas des myes, il est possible que ce taux de division n'augmente que faiblement ou bien que le taux de mortalité des cellules néoplasiques augmente lui aussi de telle sorte qu'il annule ou masque l'effet de la prolifération. Sur cette question de concentration cellulaire, la mye de l'île du Prince Edouard et la coque du bassin d'Arcachon présentent donc des caractéristiques très différentes puisque chez la coque, la concentration des cellules néoplasiques dans l'hémolymph augmente d'un facteur 9.4 entre des individus sains et des individus de stade 3. Il n'est pas possible, pour le moment d'expliquer cette différence de prolifération entre les deux modèles. Cependant,

similairement à la différence d'évolution de la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymph, précédemment suggérée, il est possible d'envisager une différence de vitesse d'augmentation des concentrations de cellules néoplasiques dans l'hémolymph entre les deux populations étudiées (Figure 48). Il est possible que dans le cas de la mye, un stade de développement supplémentaire de la maladie existe (stade 4). Celui-ci présenterait comme le stade 3 des cellules néoplasiques en très fortes proportions, mais avec une concentration de cellules circulantes totale très supérieure à celle observée pour des myes de stade 1, 2 ou 3. A notre connaissance, chez la mye, aucune étude n'avait encore analysé de façon concomitante la proportion de cellules néoplasiques (stade de développement de la maladie) dans l'hémolymph, et leur concentration. Une seule étude, réalisée sur la mye de Rhode Island, avait déterminé les différents stades de développement de la maladie en fonction de la concentration, et non pas de la proportion, de cellules néoplasiques dans l'hémolymph (Cooper et al., 1982). Cinq niveaux différents de développement avaient été déterminés : niveau 1  $< 10^4$  cellules.mL<sup>-1</sup>, niveau 2  $< 10^5$ , niveau 3  $< 10^6$ , niveau 4  $< 10^7$  et niveau 5  $> 10^7$ . Compte tenu des concentrations cellulaires et de la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymph, les myes analysées lors de cette thèse, que nous avons qualifiées de stade 3, auraient vraisemblablement été de niveau 4 selon les critères de Cooper et al. (1982). Cela appuie l'hypothèse de l'existence d'un stade de développement plus avancé de niveau 5 selon Cooper et al. (1982) qui équivaldrait à un stade 4 (plus de 75% de cellules néoplasiques dans l'hémolymph et forte prolifération) non détecté dans notre étude sur la mye. De plus, compte tenu de la variabilité de la proportion d'individus de niveau 5 lors d'un suivi sur deux ans (0-42% des individus néoplasiques) de Cooper et al. (1982), une trop faible proportion de ces individus pourrait probablement expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de myes néoplasiques présentant une prolifération cellulaire massive, lors du seul point de prélèvement effectué en mai 2008. Ainsi, chez la mye de l'île du Prince Edouard, il serait possible que le développement de la pathologie se fasse en deux temps : augmentation de la proportion des cellules néoplasiques puis de leur concentration dans l'hémolymph. La méthode d'estimation du stade de développement de la néoplasie disséminée devrait donc prendre en compte non seulement, comme proposé

par Delaporte et al. (2008), la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymphe, mais aussi leur concentration.

Enfin, la différence la plus marquante réside dans la ploïdie des cellules néoplasiques de myes. Contrairement à celles des coques, qui présentent des niveaux de ploïdie très variés, celles des myes sont quasi-exclusivement  $4n$ . Contrairement à ce qui avait été montré pour la coque, le mécanisme menant à l'aneuploïdie chez la mye semble similaire pour toutes les myes atteintes de néoplasie disséminée. De plus, ce mécanisme, menant à doubler la quantité d'ADN par cellule, est probablement plus simple que ceux à l'origine de l'aneuploïdie chez les coques. Il est possible que chez la mye il s'agisse d'une mitose suivie d'une non-disjonction des cellules filles. En imaginant un tel mécanisme, des cellules normales  $2n$  seraient ainsi transformées en cellules néoplasiques  $4n$ , potentiellement bloquées à ce stade. Ceci pourrait être une raison pour laquelle en dépit d'un taux de mitose élevé, reflétant le caractère prolifératif de la néoplasie disséminée, la proportion de cellules  $4n$  augmente mais ces cellules ne deviennent pas très prolifératives. Cette hypothèse de cellules « bloquées » en phase G2/M est appuyée par la très faible proportion de cellules  $8n$ , reflétant une très faible capacité des cellules  $4n$  à se diviser à leur tour. Un tel mécanisme serait également cohérent avec l'absence de différence de ploïdie des cellules néoplasiques en relation avec le stade de développement de la néoplasie disséminée. De plus, une absence de division des cellules néoplasiques renforce l'hypothèse précédemment exposée de développement relativement lent de la maladie, en comparaison avec celui plus « fulgurant » observé chez la coque. Le stade de développement supplémentaire de la néoplasie disséminée qui a précédemment été suggéré (stade 4) pourrait correspondre à un « déblocage » de ces cellules qui permettrait leur division et leur prolifération. Il serait alors intéressant d'étudier la ploïdie des cellules et leur distribution à ce stade.

## 4 CONCLUSION

La présente étude a tout d'abord permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de néoplasie disséminée chez la coque *Cerastoderma edule* dans le bassin d'Arcachon. Dans ce cadre, une méthode de diagnostic originale, basée sur une approche statistique de la distribution de la ploïdie a été proposée. Elle a permis de détecter des individus très peu affectés. L'observation d'une prévalence et d'une intensité supérieures chez les coques de surface par rapport à celles normalement enfouies dans le sédiment, permet de supposer que la néoplasie disséminée pourrait représenter un facteur supplémentaire pouvant expliquer la remontée des coques à la surface.

L'étude de la distribution de la ploïdie des cellules néoplasiques de coques a permis de mettre en évidence l'existence de mécanismes complexes, multiples et évolutifs menant à des aneuploïdies variables. Des études caryologiques permettraient probablement une meilleure compréhension de ces mécanismes. Il serait ainsi possible de tester l'hypothèse d'une fragmentation excessive des chromosomes pour les coques du bassin d'Arcachon. Aucune observation similaire n'a à ce jour été mise en évidence. Cependant, il n'est pas possible de savoir précisément, dans le cas des coques d'Irlande notamment (Collins, 1998), si cela est dû à l'inexistence d'un tel phénomène ou à la manière de traiter les données. L'étude de la ploïdie de cellules néoplasiques d'un grand nombre d'individus malades pourrait être réalisée sur des coques d'Irlande ou de Galice. Elle permettrait peut-être de déterminer, si le mécanisme menant à une telle diversité d'aneuploïdie est spécifique à la population d'Arcachon ou est commune à d'autres populations de coques, voire à l'espèce elle-même.

Cette aneuploïdie, ainsi que d'autres paramètres de la néoplasie disséminée ont été étudiés et comparés chez la coque et la mye. Cela a permis de mettre en évidence des caractéristiques très différentes de la pathologie. Ces différences s'expriment principalement en termes de proportion d'individus touchés, de vitesses de développement de la maladie et de prolifération des cellules néoplasiques, et enfin de mécanismes menant à



l'aneuploïdie de ces cellules. Bien que l'origine de ces différences reste inconnue, il est possible d'imaginer des interactions différentes entre le bivalve, l'inducteur de néoplasie (virus ?) et l'environnement.

Enfin, dans le cas de la mye, l'hypothèse d'un 4<sup>ème</sup> stade de développement de la néoplasie disséminée a été suggéré pour expliquer la présence d'une très forte proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymph sans qu'une augmentation de la concentration cellulaire soit observée. L'existence d'un tel stade peut être assez facilement recherchée, en analysant conjointement, en routine, la proportion et la concentration des cellules néoplasiques. De plus, nous avons suggéré que jusqu'au stade 3, les cellules ne pouvaient pas ou peu se diviser alors que cela deviendrait possible à partir du stade 4, s'il existe. La comparaison de la ploïdie de cellules néoplasiques de myes de stade 3 (exclusivement 4n) et de stade 4 serait donc intéressante à réaliser pour la compréhension de l'évolution de cette pathologie.



**CHAPITRE 3 : NEOPLASIE  
DISSEMINEE, COMPOSITIONS  
LIPIDIQUES ET FONCTIONS  
CELLULAIRES DES  
HEMOCYTES**



## CHAPITRE 3 : NEOPLASIE DISSEMINEE, COMPOSITIONS LIPIDIQUES ET FONCTIONS CELLULAIRES DES HEMOCYTES

### 1 INTRODUCTION

Ce troisième chapitre est plus particulièrement tourné vers l'étude des relations entre la structure lipidique membranaire des hémocytes et leurs fonctions. De part leur composition lipidique membranaire et leurs fonctions cellulaires particulières, nous avons montré que les hémocytes de bivalves s'avéraient être un modèle approprié (voir chapitre 1) afin d'aller plus loin dans la compréhension des fonctions associées à certaines classes et sous-classes de phospholipides et de leur composition en acides gras. La néoplasie disséminée a été choisie comme facteur potentiellement inducteur de variations de la composition lipidique et/ou des fonctions cellulaires des hémocytes. Cette étude a été réalisée sur deux espèces différentes, connues pour être affectées par la néoplasie disséminée, la coque *Cerastoderma edule*, provenant du bassin d'Arcachon (Le Grand et al., 2010) et la mye *Mya arenaria*, provenant de l'île du Prince Edouard (Canada) (Delaporte et al., 2008).

Plus précisément, les cellules circulantes de l'hémolymphe provenant d'animaux sains (hémocytes normaux) et d'animaux affectés par la néoplasie disséminée (cellules néoplasiques) ont été analysées. D'une part, nous avons étudié la composition lipidique membranaire détaillée (composition en classes et sous-classes de phospholipides et leur composition respective en acides gras). D'autre part, certains paramètres morpho-fonctionnels tels la concentration cellulaire, le pourcentage de mortalité, la capacité de phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été étudiés en parallèle.

Il s'agissait de déterminer tout d'abord si la néoplasie disséminée induisait des variations de ces paramètres, puis de les confronter afin de mettre en évidence certaines relations structure-fonction. Il s'agissait également de dégager des effets caractéristiques, communs aux deux espèces, dans le but de faire émerger des variations fonctionnelles et/ou structurales inhérentes à la néoplasie disséminée.

Les deux modèles étudiés partagent de nombreuses caractéristiques communes, mais diffèrent aussi sur certains points. En effet, bien que la coque et la mye soient phylogénétiquement proches et toutes les deux endogées, il a été montré dans le chapitre 1 que les compositions lipidiques membranaires de leurs hémocytes présentaient des spécificités marquées. Par exemple, les plasmalogènes de la coque sont spécifiquement associés aux acides gras NMI alors que ceux de la mye le sont au 20:1n-11. De plus, il a été montré dans le chapitre 2 que les caractéristiques de la néoplasie disséminée affectant les myes de l'île du Prince Edouard et celle affectant la coque du bassin d'Arcachon étaient aussi très différentes. Ainsi, il s'agissait également de déterminer si certaines modifications des structures lipidiques membranaires des cellules et de leurs fonctions pouvaient varier en fonction de l'espèce considérée.

Les résultats concernant la coque sont présentés dans la première partie de ce chapitre. Ceux découlant de l'étude menée sur la mye sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre et comparés avec ceux obtenus pour la coque.

## 2 ALTERATIONS DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE ET DES PARAMETRES FONCTIONNELS DES CELLULES CIRCULANTES DE COQUES (*CERASTODERMA EDULE*) AFFECTEES PAR LA NEOPLASIE DISSEMINEE

Les résultats de cette première partie devant faire l'objet d'une publication (« **Altered membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells in cockles (*Cerastoderma edule*) affected by disseminated neoplasia** »), ils sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, dont le résumé est également traduit en français ci-dessous.

### Résumé

La composition en classes et sous-classes de phospholipides (PL) (proportions et compositions respectives en acides gras (AG)) et en lipides neutres, ainsi que certains paramètres morpho-fonctionnels (concentration cellulaire, viabilité, phagocytose et production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)) ont été étudiés dans des cellules circulantes de coques (*Cerastoderma edule*) atteintes de néoplasie disséminée, et comparés à ceux d'hémocytes normaux provenant de coques non atteintes de néoplasie disséminée.

La concentration cellulaire est environ cinq fois plus forte dans les coques néoplasiques que dans les coques saines ( $61,2 \times 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> et  $12,4 \times 10^5$ , respectivement). Le taux de mortalité des cellules néoplasiques est significativement plus élevé que celui des hémocytes (10,3% vs. 3,4%). L'activité phagocytaire est drastiquement réduite dans les cellules néoplasiques par rapport à celle des hémocytes (27,1% vs. 49,7%). Alors que la production totale d'ERO est similaire dans les deux types de cellules, l'ajout d'un agent découpleur mitochondrial a induit une inhibition de 35.1% de la production d'ERO dans les hémocytes, tandis qu'au contraire, dans les cellules néoplasiques, cet agent n'a pas affecté la production d'ERO et l'a même parfois augmentée.

Les proportions et la composition en AG des classes et sous-classes de lipides ont été profondément affectées par la néoplasie disséminée, que ce soit dans les lipides de réserve ou les lipides membranaires. La proportion des formes plasmalogènes de la glycérophosphatidylsérine (PS) et de la glycérophosphatidyléthanolamine (PE) ont été significativement diminuées (par deux) dans les cellules néoplasiques alors qu'en parallèle, les proportions des formes diacyl+alkyl de la glycérophosphatidylcholine (PC) et de la PE ont significativement augmenté dans ces cellules. La composition en AG des toutes les classes et sous-classes de PL analysées a été significativement modifiée dans les membranes des cellules circulantes de coques malades. Les modifications les plus drastiques concernaient les AG « non-methylene-interrupted » et le 20:1n-11, associés aux formes plasmalogènes de la PE et de la PS.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la diminution de la proportion d'AG « non-methylene-interrupted » et de 20:1n-11, spécifiquement associés aux plasmalogènes, observée dans les cellules néoplasiques. Elle pourrait résulter i) d'une réduction de leur synthèse, ii) d'une dégradation liée au stress oxydant et provenant d'un changement de nature et de localisation des sources d'ERO, ou iii) de réarrangements dans la structure membranaire liés à la dé-différenciation des cellules néoplasiques.



**Altered membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells  
in cockles (*Cerastoderma edule*) affected by disseminated neoplasia**

Fabienne LE GRAND<sup>1</sup>, Edouard KRAFFE<sup>1 a</sup>, Nelly LE GOÏC<sup>2</sup>, Philippe SOUDANT<sup>2</sup> and  
Yanic MARTY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 6521 - Université de Bretagne Occidentale - 29200 Brest - France

<sup>2</sup> UMR CNRS 6539 - Institut Universitaire Européen de la Mer - 29280 Plouzané -  
France

<sup>a</sup>Corresponding author: Tel.: +33 2 98 01 61 51. Fax: +33 2 98 01 70 01. E-mail  
address: Edouard.Kraffe@univ-brest.fr (E. Kraffe).

### Abstract

Phospholipid (PL) class and subclass composition (proportions and their respective fatty acid (FA) compositions), neutral lipids, and morpho-functional parameters (total hemocyte count, viability, phagocytosis and reactive oxygen species (ROS production)) were investigated in circulating cells of cockle (*Cerastoderma edule*) affected by disseminated neoplasia and compared to those of normal hemocytes from non-diseased cockles.

Total hemocyte count was about five times higher in neoplastic cockles than in healthy cockles ( $61.2 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$  and  $12.4 \times 10^5$ , respectively). Mortality percentage of neoplastic cells was significantly higher than the one of hemocytes (10.3% vs. 3.4%). Phagocytic activity was drastically reduced in neoplastic cells when compared to hemocytes (27.1% vs. 49.7%). Total ROS production was similar in neoplastic cells and hemocytes. Addition of a mitochondrial uncoupler agent resulted in a 35.1% inhibition of ROS production in normal hemocytes, while ROS production was unaffected or increased by this agent in neoplastic cells.

Proportions and FA composition of lipid classes and subclasses were profoundly affected by disseminated neoplasia in both reserve and membrane lipids. Plasmalogen form of glycerophosphatidylserine (PS) and glycerophosphatidylethanolamine (PE) were significantly decreased (by two fold) in neoplastic cells while concomitantly diacyl+alkyl form of glycerophosphatidylcholine (PC) and PE significantly increased in these cells. FA composition of all analysed PL classes and subclasses was significantly modified in diseased cockles. The most drastic changes concern the non-methylene-interrupted (NMI) FA and 20:1n-11 associated plasmalogen forms of PE and PS.

Several hypotheses are proposed to explain the decrease of NMI and 20:1n-11 associated plasmalogens observed in neoplastic cells. Reduction of these specific plasmalogen molecular species may resulted from i) a shortage of the synthesis of their backbone and/or aliphatic chains ii) a degradation upon oxidative stress associated to the changes of ROS sources and localisation iii) some membrane structure re-arrangements upon the de-differentiation of neoplastic cells.

### **Abbreviations**

**CAEP**: ceramide aminoethylphosphonate; **CCCP**: carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazone; **CL**: cardiolipin; **LysoPC**: lysoglycerophosphatidylcholine; **FA**: fatty acids; **GPL**: glycerophospholipid; **MUFA**: monounsaturated fatty acid; **NMI**: non-methylene-interrupted; **HPLC**: high performance liquid chromatography; **HPTLC**: high performance thin layer chromatography; **PC**: glycerophosphatidylcholine; **PCplsm**: PC plasmalogen; **PE**: glycerophosphatidylethanolamine; **PEplsm**: PE plasmalogen; **PI**: glycerophosphatidylinositol; **PL**: phospholipid; **plsm**: plasmalogen; **PUFA**: polyunsaturated fatty acid; **PS**: glycerophosphatidylserine; **PSplsm**: PS plasmalogen; **ROS**: reactive oxygen species; **SFA**: saturated fatty acid; **THC**: total hemocyte counts.

## Introduction

In bivalves, internal defense is mediated by cells freely circulating in hemolymph, referred as hemocytes (Cheng, 1996; Chu, 2000). These cells act as sentry cell, scanning the immediate environment to detect foreign material and induce efficient immune response. They are responsible for non-self particles recognition and elimination, through mechanisms of chemotaxis, secretion of humoral factors, encapsulation, phagocytosis and reactive oxygen species production (Cheng, 1996; Chu, 2000). Although hemocytes functions are often thought as restricted to immunity, they play major roles in multiple physiological functions such as tissue repair, shell production and repair, nutrient digestion, transport and excretion (Cheng, 1996; Chu, 2000). Moreover, cellular defense-related parameters appeared as especially sensitive to variations of environmental factors, including temperature, nutrients, toxicants and of course diseases (Chu, 2000).

Disseminated neoplasia is one of the two predominant types of malignant neoplasia that occurs rather widely in marine bivalves. This leukemia-like disease is characterized by an excessive proliferation of abnormal circulating cells in the circulatory system and organs (Peters, 1988; Elston et al., 1992; Barber, 2004). According to the literature, these abnormal cells, or neoplastic cells, differ from the normal circulating cells, the hemocytes, by several alterations of morphological and functional characteristics (Farley, 1969a; 1976; Brown et al., 1977; Mix et al., 1979; Mix, 1983; Poder and Auffret, 1986; Rasmussen, 1986; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Krishnakumar et al., 1999; Villalba et al., 2001). Neoplastic cells are larger, anaplastic, less complex (undifferentiated and round-shaped), and have a larger nucleus, a higher nucleus-to-cytoplasm ratio, and are mitotically more active when compared to normal hemocytes. Disseminated neoplasia is progressive, with neoplastic cells showing rapid and invasive growth that, in most of cases, results in the death of the host (Cooper et al., 1982; Farley et al., 1986; Elston et al., 1988; Barber, 1990b; Brousseau and Baglivo, 1991).

In the edible cockle, *Cerastoderma edule*, disseminated neoplasia was first described in 1982 in Cork Harbour (Ireland) (Twomey and Mulcahy, 1984; 1988), and at approximately

the same time in Brittany (France) (Auffret and Poder, 1986; Poder and Auffret, 1986). More recently, this pathological condition was detected in cockles from Galicia (Spain) (Rodriguez et al., 1997; Carballal et al., 2001; Villalba et al., 2001; Ordas and Figueras, 2005) and from the Bay of Arcachon (Le Grand et al., 2010).

Recent studies suggested relationships between FA composition of membrane lipids and bivalve hemocyte functions (Delaporte et al., 2006; Delaporte et al., 2007). These preliminary results emphasized the possible roles of the fatty acid (FA) moiety of membrane lipid constituents in relation to hemocyte functions. In vertebrates, the concept of a relationship between membrane FA composition and function of immune cells has emerged about three decades ago (Calder, 2008). However, more and more, membrane PL related functions emerge to depend not only on the global FA composition but also on specific composition of the individual membrane phospholipid (PL), determined by particular polar heads (choline, serine, ...), linked to particular FA, by different linkages (ester, vinyl ether, ether) (Phillips et al., 2009).

Bivalve hemocytes represent interesting models for the study of the implication of membrane PL in cell functions, particularly in response to pathological conditions. As disseminated neoplasia affects hemocytes, it is expected that this disease would result in modifications of membrane lipid composition as well as in morpho-functional characteristics of hemocytes.

To establish structure-functional relationships at the cellular level, PL class and subclass composition (proportions and their respective FA composition) and morpho-functional parameters (total hemocyte counts, viability, phagocytosis, reactive oxygen species (ROS) production) of neoplastic cells and normal hemocytes were investigated and compared.

## **Material and methods**

### ***Chemicals***

High performance liquid chromatography (HPLC) grade solvents were purchased from VWR International. Butylated hydroxytoluene (BHT), boron trifluoride (BF<sub>3</sub>, 14% by weight in methanol) propidium iodide (PI), 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazone (CCCP) were obtained from Sigma-Aldrich. SYBR Green I was purchased from Molecular Probes. Fluorescent beads were 2 µm yellow-green latex from Fluoresbrite. Silica gel 60 (63-230µm mesh) was purchased from Merck. Diol phase columns were OH-bound silica gel columns, K5OH\*25QS, 250 x 4mm i.d., from Interchim. Polar capillary column was a CPWAX 52 CB - 25 m x 0.25 mm i.d.; 0.2 µm thickness and the non-polar one was a CP-Sil 8 CB - 25 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm thickness and were obtained from Varian.

### ***Lipid analysis***

#### ***Sample preparation and lipid extraction***

Adult cockles (*Cerastoderma edule*) were collected in October 2007 from Banc d'Arguin, Arcachon Bay (France). Hemolymph was withdrawn from posterior adductor muscle through the shell hinge using 25-gauge sterile hypodermic needle attached to a 1-mL plastic syringe. Hemolymph from each individual was kept on crushed ice to prevent hemocyte clotting. Hemolymph samples were then examined microscopically for contamination. Any hemolymph sample deemed of low quality was not use for lipid analysis.

Optical microscopic observations of fresh hemolymph samples also allowed a rapid diagnosis of disseminated neoplasia (Le Grand et al., 2010). Hemolymph samples were considered as healthy if no neoplastic cell was observed and as diseased if one or more neoplastic cell was observed. Different disease development stages were determined for diseased cockles according to the proportion of neoplastic cells in hemolymph. Cockles were

considered as lightly to moderately diseased if hemocytes could be observed upon microscopical observation of fresh hemolymph samples and as highly diseased if almost only neoplastic cells were observed. To ensure diagnoses reliability, 100  $\mu\text{L}$  of hemolymph sample was stocked in 400  $\mu\text{L}$  of ethanol for subsequent individual flow cytometry diagnosis of disseminated neoplasia following the method described by Le Grand et al. (2010). Although optical microscopic diagnosis on fresh non-stained samples was rapid and gross, further flow cytometry analyses revealed that this provided a reliable estimation of disseminated neoplasia presence and development (Le Grand et al., 2010). As only hemolymph samples from “healthy” and “highly diseased” cockles were kept for further lipid analysis, the term “diseased” was used in place of “highly diseased” in the rest of the study, for an easier comprehension.

Hemolymph samples of at least twenty healthy individuals were then filtered through 80 $\mu\text{m}$  mesh sieve and transferred in a glass vial maintained on ice, to obtain a pool of 18 mL hemolymph. Three replicates were prepared following this procedure. Similarly, samples from three diseased cockles were filtered through 80 $\mu\text{m}$  mesh sieve and were, individually, transferred in glass vials maintained on ice, to obtain three replicates of approximately 0.5 mL. Using a Malassez’s cell, circulating cell concentrations were determined for each replicate. Hemolymph was then centrifuged at 400  $g$  (15min, 4°C) to pellet circulating cells. After centrifugation, hemolymph supernatant was removed from the vials. Lipid extraction of circulating cells was conducted by resuspending pellets in 10 mL of a mixture of chloroform/methanol mixture (2:1, vol/vol). To ensure a complete lipid extraction, vials were sonicated 10 minutes at 4°C. After adding 0.01% by weight of BHT as antioxidant, extracts were stored at -20°C under nitrogen before analysis.

#### ***Separation of neutral and polar lipids on a silica gel microcolumn***

Lipid extracts were evaporated to dryness, recovered with three washing of 0.5 mL chloroform/methanol (98:2, vol/vol) and deposited at the top of a silica gel microcolumn (40 mm x 5 mm i.d., silica gel previously heated at 450°C and deactivated with 6% water by weight) (Marty et al., 1992). Neutral lipids were eluted with 10 mL of chloroform/methanol (98:2, vol/vol). Polar lipids were eluted with 20 mL of methanol. These fractions were

respectively used for separation of neutral lipid classes by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and for separation of phospholipid (PL) classes and subclasses by HPLC and their FA composition analysis.

### ***Separation of phospholipid classes***

Separation of PL classes and subclasses was achieved according to Kraffe et al. (2004) using a combination of two successive HPLC separations with two different mobile phases. The first separation was achieved on a Diol phase column and allowed the collection of a first fraction containing glycerophosphatidylethanolamine (PE; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms), ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) and glycerophosphatidylcholine (PC; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms), and a second fraction containing cardiolipin (CL), glycerophosphatidylinositol (PI), glycerophosphatidylserine (PS; 1,2-diacyl + 1-alkyl-2-acyl + 1-alkenyl-2-acyl forms) and lysoglycerophosphatidylcholine (LysoPC). PE, PC and PS were then treated separately for separation of 1-alkenyl-2-acyl forms (plasmalogens). As previously described Soudant et al. (1995), the use of an acidic mobile phase allows the hydrolysis of the vinyl ether bond at the *sn*-1 position of the glycerol backbone of the plasmalogen forms and creates lyso analogs that elute later than intact 1-2-diacyl and 1-alkyl-2-acyl forms. The suffixes “plsm” and “diacyl+alkyl” were used to designate respectively plasmalogen and non-plasmalogen forms of PC (PCplsm and PCdiacyl+alkyl), PE (PCplsm and PCdiacyl+alkyl) and PS (PCplsm and PCdiacyl+alkyl).

### ***FA analysis***

The ten PL class and subclass fractions were separated and collected. Fractions were evaporated at 40°C in a vacuum centrifuge, but were not allowed to dry completely in order to prevent the degradation of unsaturated FA in the acidic phase, in particular those at the *sn*-2 position of plasmalogens (Soudant et al., 1995). Those fractions were then transesterified during 10 minutes at 100°C after adding 800 µL of BF<sub>3</sub>, 0.01% w/w BHT as antioxidant and C23:0 as internal standard. Due to the difficulty to break the amide bond, CAEP was transesterified during 5 h at 100°C following a protocol adapted from Morrison and Smith (1964). After cooling and adding 800 µL of hexane, the organic phase, containing fatty acid



(FA) methyl-ester, was washed three times with 1.5 mL of hexane saturated water. Organic phase was recovered and analyzed in a Varian CP 8400 gaz chromatograph equipped with an on-column injector and a flame ionization detector. FA methyl-esters were identified using both polar and non-polar capillary columns, by means of known standard mixtures (Soudant et al., 1995).

#### ***Calculation of PL class amounts and FA compositions***

The quantities of each PL class and subclass were determined from their respective FA spectrum obtained by gas chromatography, using C23:0 as internal standard. Integration and calculations were done with the software program Galaxie 1.9.3.2 (Varian). To obtain the molar content of each analyzed fraction, a calculation factor was applied to their respective total FA molar contents: x1 for plasmalogens, CAEP and LysoPC; x1/2 for PI and the diacyl+alkyl form of PE, PC and PS, and x1/4 for the CL. FA were expressed as the molar percentage of total FA content of each class or subclass. For plasmalogen subclasses, the total percentage was adjusted to 50% to take into account the absence of alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase.

#### ***Separation of neutral lipids***

Neutral lipid classes were analyzed by HPTLC on glass plates (1010 mm) pre-coated with silica gel. A preliminary run was carried out to remove possible impurities using hexane/diethyl ether (1:1, v/v) and the plate was activated for 30 minutes at 110°C. Lipid samples (4 µL) were spotted on the plates by the CAMAG automatic sampler (CAMAG). Neutral lipids were separated using a double development with a first solvent system containing hexane/diethyl ether/acetic acid (20/5/0.5, v:v:v) followed with hexane/diethyl ether (93/3, v:v) as a second solvent. Neutral lipid classes appeared as black spots after dipping plates in a cupric sulfate, phosphoric acid solution and heating for 20 minutes at 160°C (charring). Seven neutral lipid classes (free fatty acids, sterol esters, glyceride ethers, monoacylglycerol, diacylglycerol, triacyl glycerols and sterols) were identified based upon authentic standards and coloring techniques. The charred plates were read by scanning at 370 nm, and black spots were quantified using Wincats software (CAMAG).

### ***Functional analyses***

In March 2008, functional parameter analyses were performed on healthy and diseased cockles collected at Banc d'Arguin, Arcachon Bay (France). Cockle hemolymph was withdrawn as previously described, transferred into an individual microtube and kept on crushed ice. Disseminated neoplasia diagnosis was firstly established upon optical microscopy observation of these fresh hemolymph samples and was later confirmed and staged by flow cytometry as previously described. Among 25 cockles, 19 were considered as healthy and 6 as highly diseased. Functional analyses were performed using a Guava (Millipore) flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser, and with a 96-well microplate autosampler. Two types of hemocyte variables were evaluated by flow cytometry: descriptive variables (hemocyte mortality and total hemocyte counts (THC)), and functional variables (phagocytic activity and reactive oxygen species (ROS) production). Analyses were realized following protocols described by Haberkorn et al. (2009) with volumes adjusted to 200  $\mu\text{L}$  according to well volume capacity of 96-well microplates.

### ***Viability***

In each hemolymph individual sample, viability was determined by adding 100  $\mu\text{L}$  of antiaggregant solution (Auffret and Oubella, 1995) to 50  $\mu\text{L}$  of filtered sterile seawater (FSSW) and 50  $\mu\text{L}$  of hemolymph. Samples were incubated 2 h at 18°C in darkness with 2  $\mu\text{L}$  of SYBR Green I (commercial solution diluted to 0.1% in FSSW), and 2  $\mu\text{L}$  of PI ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  in FSSW). SYBR Green I and PI are nucleic acid-specific dyes (both DNA and RNA). PI permeates only hemocytes that lose membrane integrity and considered to be dead cells, whereas SYBR Green I permeates both dead and live cells. SYBR Green I green fluorescence was measured at 500-530 nm whereas PI red fluorescence was measured at 550-600 nm by flow cytometry. On a cytogram plotting green fluorescence vs. red one, counting the cells stained by both PI and SYBR Green I (dead cells) and cells stained by SYBR Green I (live and dead cells), it was possible to precisely estimate the percentage of dead cells.

### ***Total hemocyte count (THC)***

For determination of THC, 50  $\mu$ L of hemolymph was fixed with 100  $\mu$ L of a 6% formalin solution and 50  $\mu$ L of FSSW. Samples were incubated with 2  $\mu$ L of SYBR Green I (commercial solution diluted to 0.1% in FSSW) in darkness at room temperature for 30 minutes before flow cytometric analyses. Hemocyte concentrations were estimated taking into account flow cytometer flow-rate and number of cells stained by SYBR Green I, according to Lambert et al. (2007).

### ***Phagocytosis***

50  $\mu$ L of hemolymph, primarily diluted with 100  $\mu$ L of FSSW, was brought in contact with 15  $\mu$ L of a working solution of fluorescent beads (commercial solution diluted to 2% in FSSW). Tubes were incubated for 2 h at 18 °C in dark condition, and were subsequently stored, before analysis, in crushed ice to block phagocytosis. Flow cytometric hemocyte analysis at 500-530 nm allowed detecting hemocytes containing fluorescent beads. Phagocytic activity was calculated as the percentage of hemocytes that have ingested three fluorescent beads or more (Delaporte et al., 2003).

### ***Reactive oxygen species production***

A 70  $\mu$ L aliquot of hemolymph was diluted with 130  $\mu$ L of FSSW and 2  $\mu$ L of the DCFH-DA solution (final concentration of 0.01 mM) was added to each tube (Lambert et al., 2003). Tubes were then incubated for 2 h at 18 °C. After the incubation period, DCF green fluorescence, quantitatively related to ROS production of hemocytes, was measured at 500-530 nm by flow cytometry. Results are expressed as the mean geometric fluorescence (in arbitrary units, AU). ROS production in presence of CCCP, an uncoupling agent which specifically increase the proton permeability, and disconnect the electron transport chain from the formation of ATP (Smiley et al., 1991; Salvioli et al., 1997), was measured in the same way, by adding 2  $\mu$ L of CCCP (final concentration of 0.01 mM) in the 96-well microplate well prior to addition of hemolymph and FSSW.

### ***Statistics***

Normality of the data distribution and their homoscedasticity were respectively tested using Shapiro-Wilks and Levene tests. Two means were compared using a t-test. Before mean comparison, percentages were transformed to  $\arcsin(\sqrt{x})$ . Statistical analyses were processed with Statistica (StatSoft Inc., version 8.0). Data were expressed as mean  $\pm$  standard error. The probability thresholds  $\alpha < 0.1$ ,  $\alpha < 0.05$  and  $\alpha < 0.01$  were respectively noted \*, \*\* and \*\*\*.



## **Results**

### ***Lipid composition***

#### ***Global composition***

The quantity of PL was  $12.3 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  in neoplastic cells and was 2.4 times higher in hemocytes ( $5.1 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$ ) (Figure 50A). Among PL, quantities of total diacyl+alkyl forms (PC; PE and PS) and of CAEP were significantly higher in neoplastic cells than in hemocytes ( $8.0 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $2.2 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  for diacyl+alkyl subclasses and  $1.7 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $0.7 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  for CAEP, respectively), whereas similar quantities of total plasmalogens were observed in both cell types ( $2.7 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $2.2 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ , respectively in neoplastic cells and in hemocytes) (Figure 50A, insert). Sterols presented similar quantities in neoplastic cells and in hemocytes ( $3.2 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $3.7 \text{ nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ , respectively). As a consequence, proportion of sterols in cell membranes of neoplastic cells was significantly lowered by 50% as compared to normal hemocytes (20.5% and 42.1%, respectively) (Figure 50B). Total neutral lipids were 4.3 times higher in neoplastic cells than in hemocytes ( $1013 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$  and  $237 \text{ ng} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ , respectively) (Figure 50C).

#### ***Composition of neutral lipid classes***

Five identified neutral lipid classes and an unknown one were detected (Figure 51). In hemocytes, triacylglyceride was the major one, followed by free FA, the unknown class, alcohols and sterol esters, respectively accounting for 52.2%, 26.6%, 8.9% and 1.6% of total neutral lipids. The unknown peak had a Rf value close to triacylglycerides. Neutral lipid class proportions differed drastically between hemocytes and neoplastic cells. In neoplastic cells, relatively to hemocytes, the proportions of free FA (38.6%) and of the unknown class (43.2%) were significantly higher than in hemocytes (26.6% and 10.6%, respectively). Concomitantly, neoplastic cells were found to contain triacylglycerides in significantly lower proportion than in hemocytes (7.6% and 52.2%, respectively). Proportions of alcohols and sterol esters were similar in both cell types, accounting respectively for about 8% and 2% of total neutral lipids.

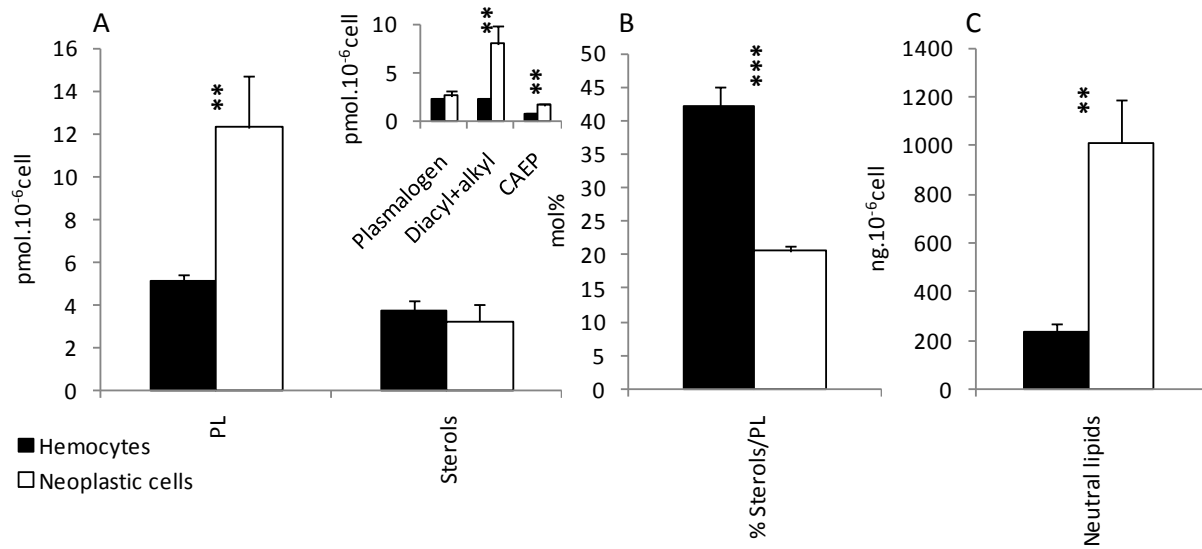


Figure 50: A: Total phospholipid (PL), PL class and subclass (diacyl+alkyl, plasmalogen and CAEP are detailed in insert) and sterol quantities, expressed in nmol.10<sup>-6</sup>cells. B: Percentage of sterol among membrane lipids (PL + sterols), expressed in mol%. C: Neutral lipid quantities, expressed in ng.10<sup>-6</sup>cells. Data are mean  $\pm$  standard error (n=3). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

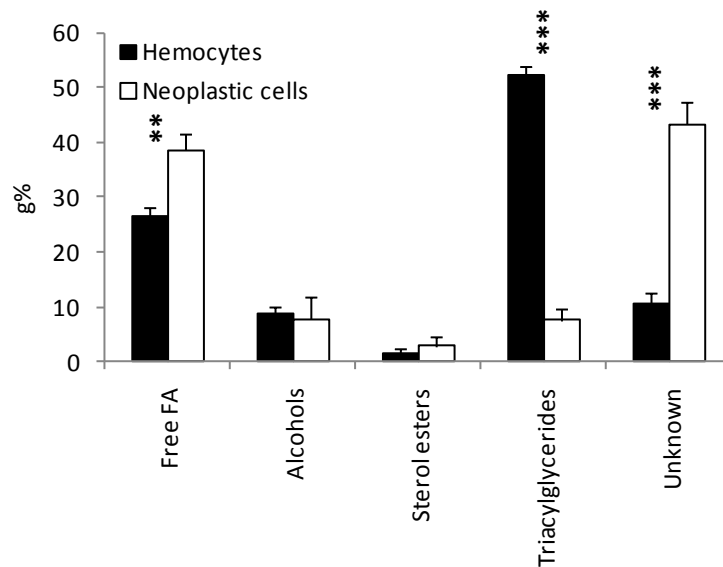


Figure 51: Composition in neutral lipid classes. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in g% of total neutral lipids. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

### **Composition in PL classes and subclasses**

PEplsm, PCdiacyl+alkyl and CAEP were the three major classes and subclasses of hemocyte membrane lipids from *C. edule*, accounting together for more than 75% of total PL (Figure 52). The PEdiacyl+alkyl, PSdiacyl+alkyl, PCplsm, PSplsm, PI, CL and LysoPC, represented each less than 5% of total PL. Plasmalogen forms of PL were found to be important in *C. edule* hemocytes, reaching 44.2% of total PL. The PEplsm subclass accounted for 87.9% of PE whereas the PCplsm constituted only 14.1% of PC. PS was half composed of plasmalogen and diacyl+alkyl forms. Proportions of PI, CL, CAEP and LysoPC did not vary between neoplastic cells and hemocytes. The three diacyl+alkyl PL classes were found to be 1.5 to 2.1 higher in neoplastic cells compared to hemocytes. This pattern was significant for the two main diacyl+alkyl PL classes, PC and PE, with proportions of 27.3% and 40.4% for PCdiacyl+alkyl and 4.9% and 10.1% for PEdiacyl+alkyl, respectively in hemocytes and neoplastic cells. Conversely, the proportions of plasmalogen subclasses showed 1.8 to 2.1 fold lower proportions in neoplastic cells than in hemocytes. Proportions were 2.8% and 4.1% for PCplsm, 17.1% and 36.6% for PEplsm and 1.9% and 3.5% for PSplsm, respectively. Consequently, a two times significant lower proportion of total plasmalogen was found in neoplastic cells compared to hemocytes (21.7% and 44.2%, respectively) as well as lower proportions of plasmalogen forms within each of the three plasmalogen-containing PL classes (6.2% and 14.1% of PCplsm in PC, 61.8% and 87.9% of PEplsm in PE and 29.3% and 50.2% of PSplsm in PS, respectively).



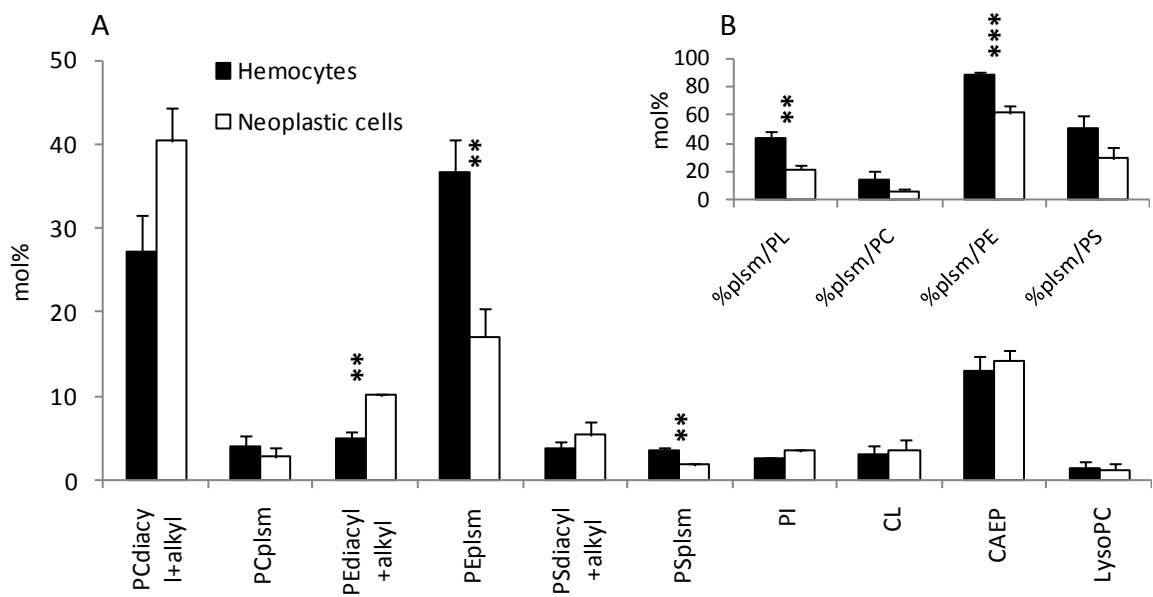


Figure 52: A: Composition in phospholipid (PL) classes and subclasses. B: Ratio of the plasmalogen form to the diacyl + alkyl + plasmalogen forms of a PL class Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3), in mol% of total PL (A) or of total class (B). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

### ***FA composition of neutral lipids***

In cockle hemocytes, total neutral lipids were found to be mainly composed of 16:0, 18:0, 18:1n-9, 20:5n-3 and 22:6n-3, accounting respectively for 21.0%, 15.6%, 9.1%, 12.8% and 7.1% (Figure 53). FA composition of neutral lipids significantly differed between hemocytes and neoplastic cells, with a higher proportion of SFA in neoplastic cells than in hemocytes (67.7% and 44.8%, respectively) counterbalanced by a lower proportion of PUFA (13.2% and 35.1%, respectively). This higher SFA proportion found in neoplastic cells was principally due to significant higher proportion of 16:0 and 18:0 (31.6% and 31.5%, respectively). Lower PUFA proportion observed in neoplastic cells was the result of lower proportions of major PUFA, such as 20:5n-3, 20:4n-6 and 22:6n-3. Proportion of NMI was observed to be significantly lower in neoplastic cells than in hemocytes (0.7% and 3.6%, respectively).

### ***FA composition of PL classes and subclasses***

#### ***PI, LysoPC, CL and CAEP***

In PI, proportion of MUFA was significantly higher in neoplastic cells, as compared to hemocytes (26.0% and 17.4%, respectively), due to a significant higher proportion of 20:1n-7 (13.1% and 7.0%, respectively) (Figure 53). This was counterbalanced by lower proportion of 18:0 (16.8% and 24.5%, respectively), resulting in a lower SFA proportion (29.5% and 39.9%, respectively). Although not significant, 20:1n-9 presented also higher proportion in neoplastic cells than in hemocytes (4.6% and 2.4%, respectively).

LysoPC FA composition did not differ markedly between neoplastic cells and hemocytes, although the proportion of 16:1n-7 was found significantly lower in neoplastic cells (2.4% and 6.4%, respectively) (Figure 54). This FA reached its highest level in LysoPC of hemocytes. Some tendencies were also noted, like a lower 16:0/18:0 ratio in neoplastic cells than in hemocytes, resulting from a lower proportion of 16:0 (27.9% and 33.6%, respectively) and a higher proportion of 18:0 (23.2% and 17.9%, respectively). The

proportion of 20:1n-7 was nearly 4 times higher in neoplastic cells than in hemocytes (3.4% and 0.9%, respectively), whereas the proportion of NMI tended to be lower (9.0% and 12.9%, respectively).

CL was composed by high levels of SFA (18:0 and 16:0) equivalent to those of PUFA (20:5n-3 and 22:6n-3). MUFA (mainly 18:1n-9) accounted for about 10% of total FA in the class. FA composition was quite similar between neoplastic cells and hemocytes (Figure 54).

CAEP was mainly composed of 16:0, found to be significantly lower in neoplastic cells than in hemocytes (76.8% and 80.8%, respectively) (Figure 54). The opposite was observed for 18:0 (7.1% and 3.6%, respectively) resulting in a lower 16:0/18:0 ratio in neoplastic cells than in hemocytes (10.8 and 22.4, respectively). Branched FA proportion did not differ between neoplastic cells and hemocytes and reached their highest level in CAEP (about 4.5%).

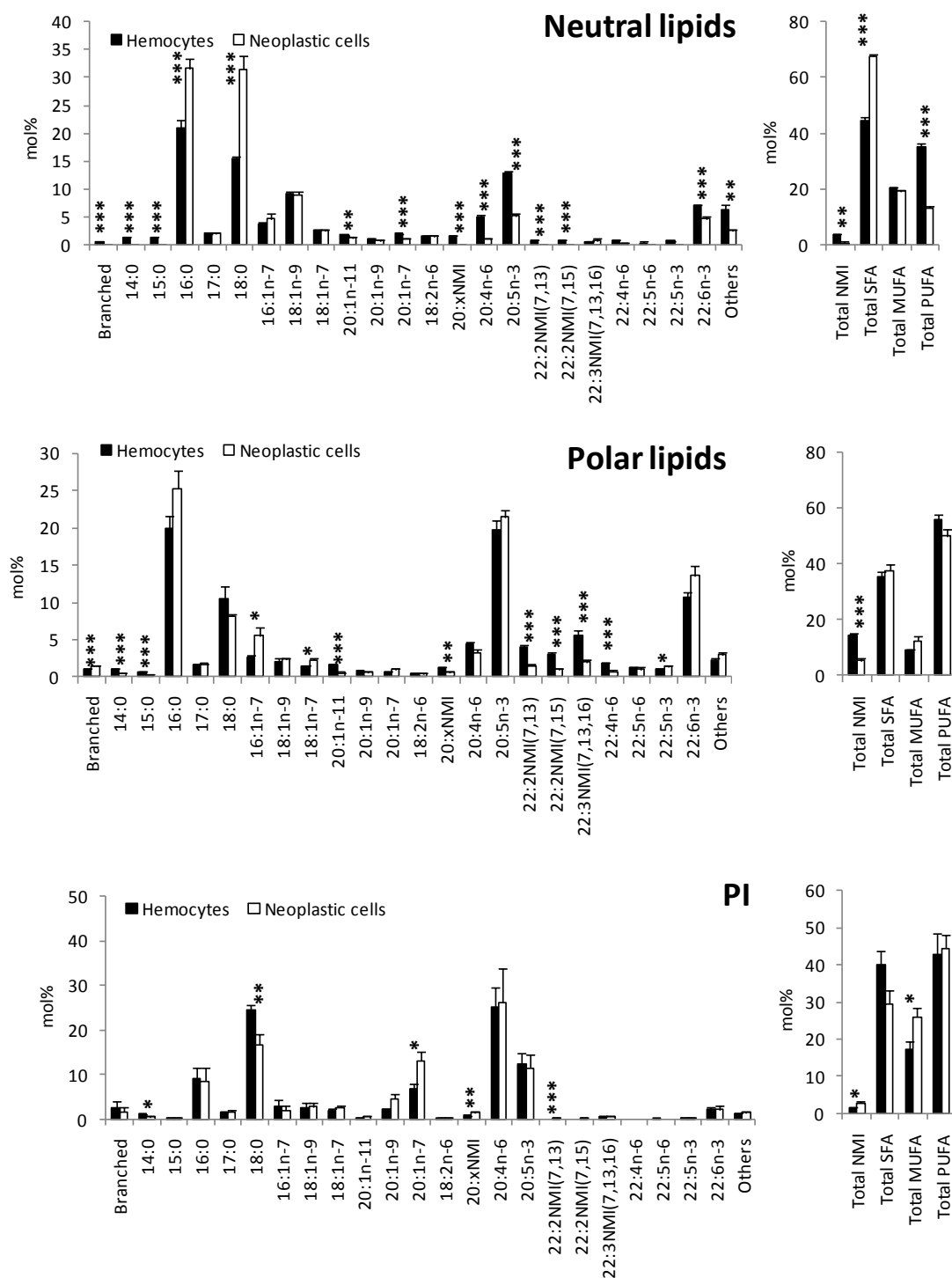


Figure 53: Fatty acid (FA) composition of total neutral lipids, polar lipids and PI. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

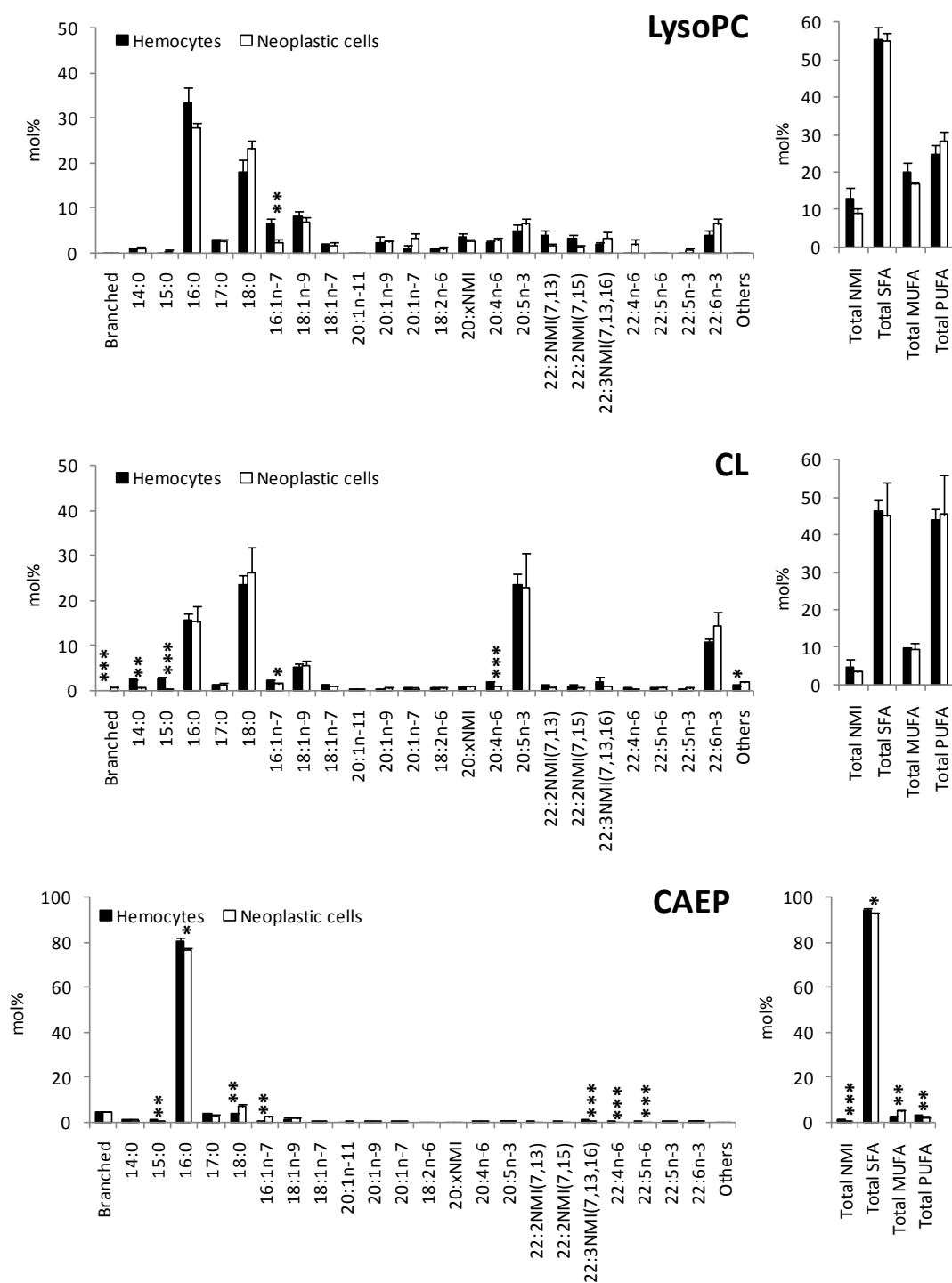


Figure 54: Fatty acid (FA) composition of Lyso PC, CL and CAEP. Results are expressed as mean ± standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

### ***Diacyl+alkyl subclasses***

In diacyl+alkyl subclasses, although the proportion of total SFA did not vary, the proportion of 16:0 was higher in neoplastic cells than in hemocytes (27.8% and 22.8% in PCdiacyl+alkyl, 21.4% and 10.2% in PEdiacyl+alkyl and 10.4% and 6.5% in PSdiacyl+alkyl, respectively). Conversely, the proportion of 18:0 was lower in neoplastic cells than in hemocytes (2.3% and 8.0% in PCdiacyl+alkyl, 10.3% and 24.9% in PEdiacyl+alkyl and 30.9% and 41.2% in PSdiacyl+alkyl, respectively) (Figure 55). Although the general tendency 16:0 >>18:0 in PCdiacyl+alkyl and 18:0 >>16:0 in PSdiacyl+alkyl was conserved in both cell types, neoplastic cells presented an inversion between 18:0 and 16:0 in PEdiacyl+alkyl.

Proportion of MUFA in diacyl+alkyl subclasses ranged from 8.0% to 12.4%, and was similar between neoplastic cells and hemocytes. Proportions of individual MUFA were also similar. One exception is the proportion of 16:1n-7 which was significantly higher in PEdiacyl+alkyl and tended to be higher in PC diacyl+alkyl of neoplastic cells than in those of hemocytes (10.3% and 4.7% for PEdiacyl+alkyl and 7.1% and 4.1% for PC diacyl+alkyl, respectively).

Total NMI FA proportions in PEdiacyl+alkyl and PSdiacyl+alkyl were found to be significantly lower in neoplastic cells than in hemocytes (2.5% and 7.5% for PEdiacyl+alkyl and 9.3% and 14.8% for PSdiacyl+alkyl, respectively). This was principally related to significant lower proportions of 22:2NMI(7,13), 22:2NMI(7,15) and 22:3NMI(7,13,16) in PEdiacyl+alkyl and of 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15) in PSdiacyl+alkyl. Additionally, 20:4n-6 presented lower proportion in neoplastic cells than in hemocytes in PCdiacyl+alkyl and PEdiacyl+alkyl (2.3% and 5.0% in PCdiacyl+alkyl and 2.0% and 5.7% in PEdiacyl+alkyl, respectively). Inversely, higher proportion of 22:6n-3 in neoplastic cells than in hemocytes was found, but only significant in PSplsm (6.5 and 2.4%, respectively).

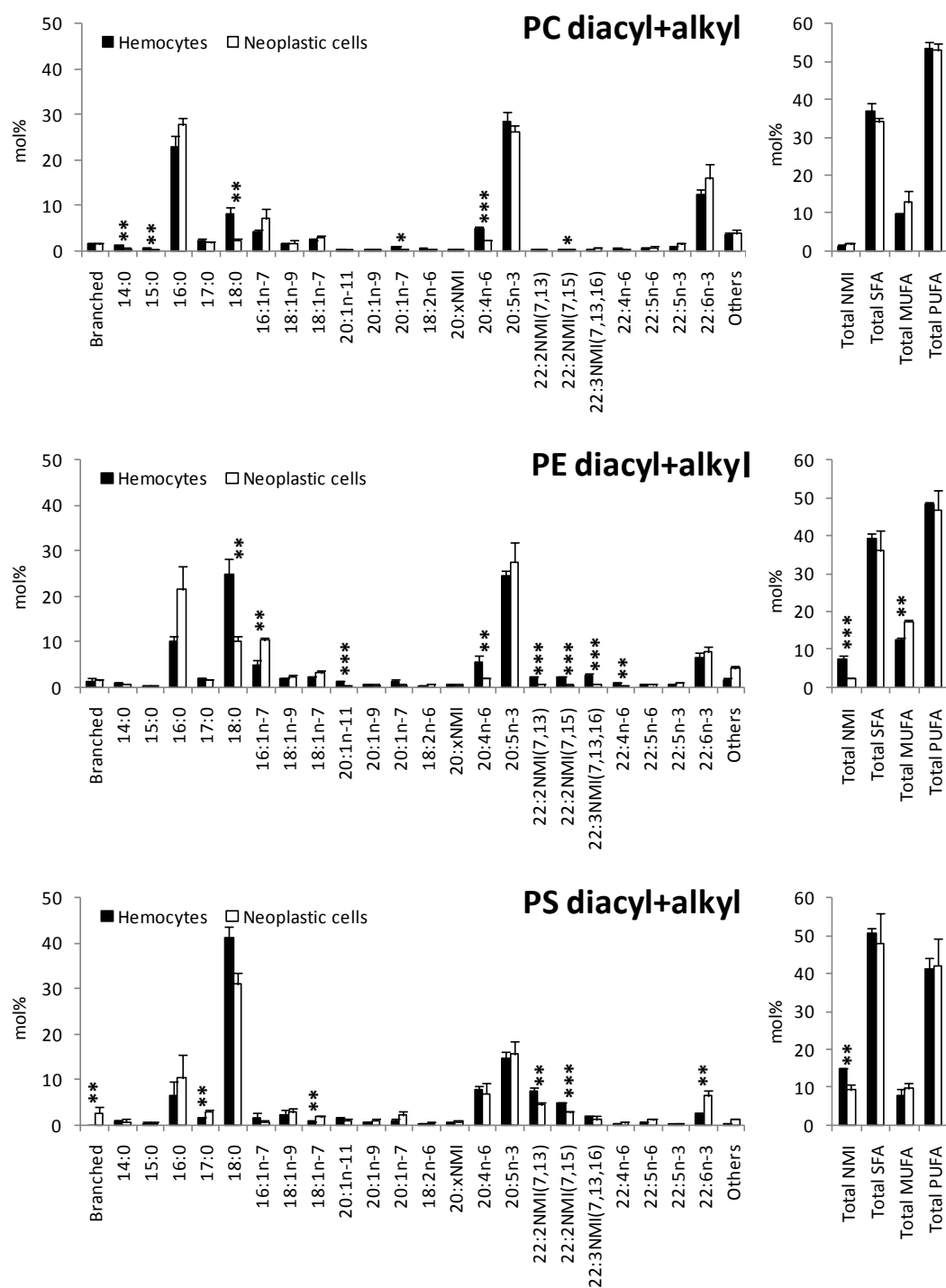


Figure 55: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

### ***Plasmalogen subclasses***

Plasmalogen subclasses were the most modified in neoplastic cells when compared to hemocytes (Figure 56).

The proportion of SFA, low in PEplsm compared to intermediate values presented by the other two plasmalogen subclasses, was found higher in neoplastic cells than in hemocytes (3% and 1.3% for PEplsm, 21.0% and 15.0% for PCplsm, and 22.4% and 13.7% for PSplsm, respectively). These differences were significant except for PSplsm SFA. In plasmalogen subclasses, higher SFA proportion observed in neoplastic cells was mainly the result of higher proportions of both 16:0 and 18:0.

As for SFA, MUFA were low in PEplsm (3.6% of total FA of the subclass) and slightly more important in the two other subclasses (5-10%). Proportions of total MUFA in neoplastic cells compared to hemocytes were found only different in PCplsm (8.4 and 5.7%, respectively). However, important changes in individual MUFA composition occurred in PEplsm and PSplsm. Proportions of 20:1n-11, the main MUFA in PEplsm and PSplsm were found to be lower in neoplastic cells than in hemocytes (1.1% and 2.1% in PEplsm, 2.3% vs. 5.9% in PSplsm, respectively). In PSplsm, a significant higher proportion of 16:1n-7 and 18:1n-9 was also observed in neoplastic cells than in hemocytes (5.3% and 1.1% and 2.8% and 1.4%, respectively).

The main PUFA were, in PCplsm, 20:5n-3 and 22:5n-6. Lower PUFA proportion in neoplastic cells compared to normal hemocytes was mainly attributed to significantly lower levels of 20:5n-3 (6.9% and 11.7%, respectively) and at lesser extent of 20:4n-6 (0.8% and 2.3%, respectively). Proportions of 22:4n-6 were found to be significantly lower in neoplastic cells, in PEplsm and PSplsm (1.9% and 3.1% of the total FA of the subclass for PEplsm and 0.5% and 1.1% for PSplsm, respectively). In all plasmalogen subclasses, proportions of 22:5n-3 were found to be significantly higher in neoplastic cells than in hemocytes (1.1% and 0.7% for PCplsm, 2.5% and 1.1% for PEplsm and 0.4 % and 0.1% for PSplsm, respectively). Proportion of 22:6n-3 in PEplsm was found to be almost two times higher in neoplastic cells than in hemocytes (15.1% and 8.3%, respectively).



Among PUFA, NMI FA were present in remarkably high proportions in hemocyte plasmalogens, especially in PEplsm and PSplsm (21.4% and 18.1% of total FA of the subclass, respectively). The three main NMI FA were 22:2NMI(7,13), 22:2NMI(7,15) and 22:3NMI(7,13,16). The relative proportion of these three NMI FA varied according to plasmalogen subclasses. In PEplsm, 22:3NMI(7,13,16) was predominant, whereas they were 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15) in PSplsm. Main differences observed in plasmalogen subclasses between neoplastic cells and hemocytes concerned NMI FA proportions. Indeed, plasmalogen subclasses, proportions of combined NMI FA were 1.6 to 2.1 times lower in neoplastic cells than in hemocytes (2.7% vs. 5.5% of total FA of the subclass in PCplsm, 13.1% vs. 21.4% in PEplsm and 10.0% vs. 18.1% in PSplsm). In PEplsm, each NMI FA had lower levels in neoplastic cells, while in PSplsm it was only the case for 22:2NMI(7,13) and 22:2NMI(7,15).

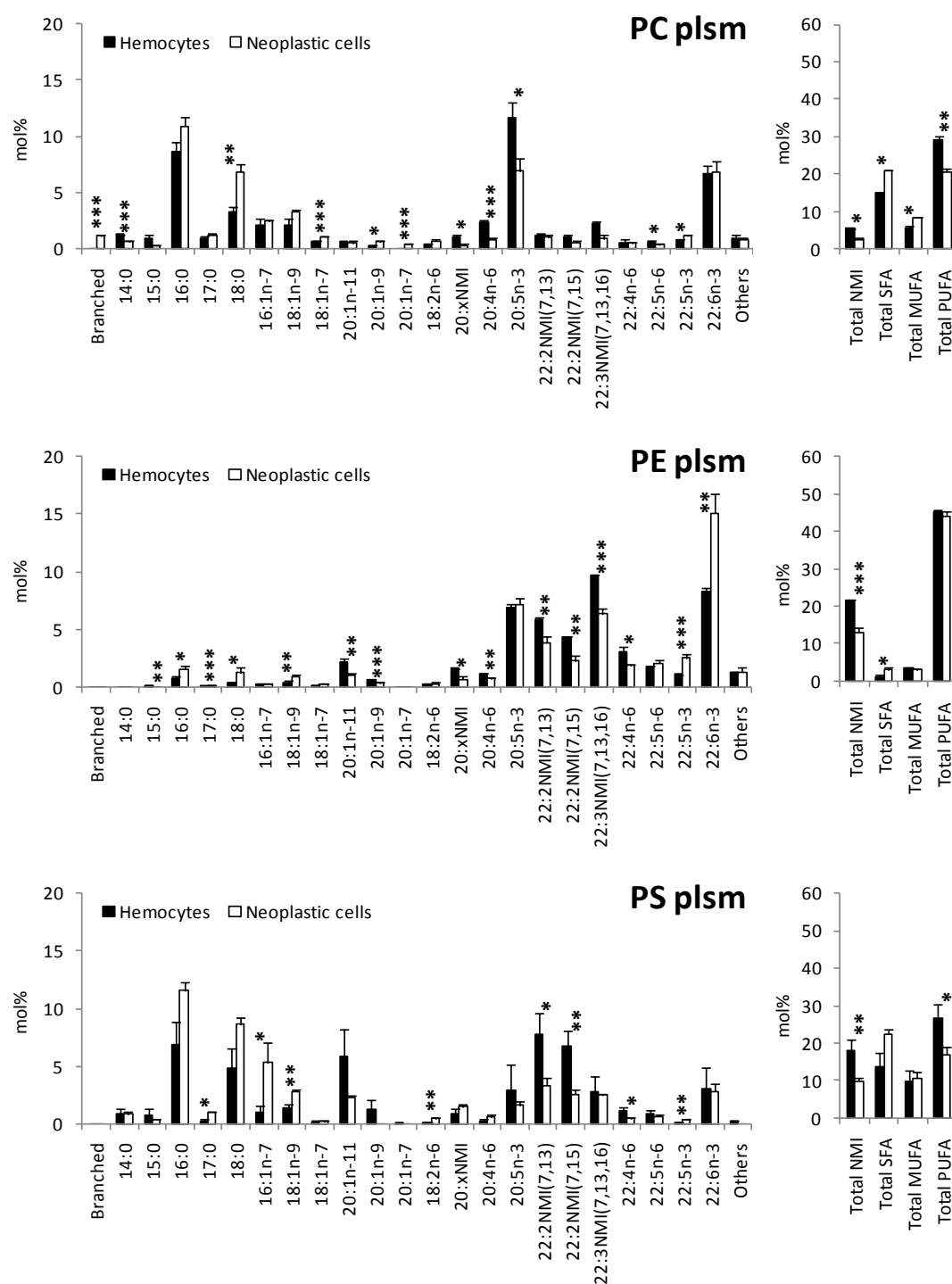


Figure 56: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. The total percentage of *sn*-2 FA was adjusted to 50% to take into account the alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase as described in the Material and Methods section. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

### NMI FA and 20:1n-11 and Plasmalogens

In total PL, significant lower proportions of NMI FA and 20:1n-11 were observed in neoplastic cell membranes than in hemocytes (5.3% and 14.1% of FA of the total PL for NMI FA and 0.6% and 1.7% for 20:1n-11, respectively) (Figure 57A). Also, markedly lower proportions plasmalogen molecular species containing NMI and 20:1n-11-were found in neoplastic cells than in hemocytes (Figure 57B).

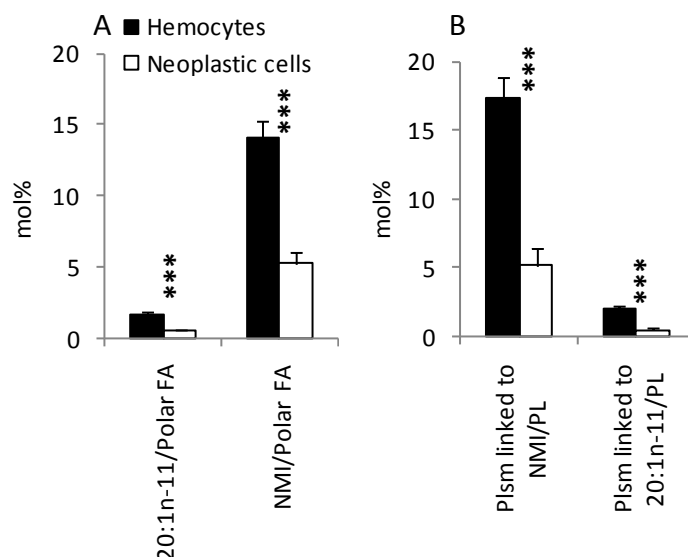


Figure 57: A: proportion of 20:1n-11 and NMI FA, expressed in mol% of the total polar FA. B: Proportion of 20:1n-11 and NMI FA linked to plasmalogen, expressed in mol% of total 20:1n-11 and NMI FA. C: Proportion of 20:1n-11-plasmalogen and NMI FA-plasmalogen molecular species, expressed in mol% of total PL. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

***Functional parameters***

THC, mortality level and phagocytic activity presented significantly different values between hemocytes and neoplastic cells. Total hemocyte count was about five times higher in neoplastic cockles than in healthy cockles ( $61.2 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$  and  $12.4 \times 10^5$ , respectively) (Figure 58A). Mortality percentage of neoplastic cells was three times higher than the one of hemocytes (10.3% vs. 3.4%) (Figure 58B). Phagocytic activity was reduced in neoplastic cells when compared to hemocytes (27.1% vs. 49.7%) (Figure 58C). Total ROS production was similar in neoplastic cells and in hemocytes (315 A.U. and 348 A.U., respectively in hemocytes and neoplastic cells) (Figure 58D). Addition of CCCP (a mitochondrial uncoupler agent) resulted in a significant decrease of ROS production in hemocytes (348 A.U. and 205 A.U., respectively in without and with CCCP) but not in neoplastic cells (315 A.U. and 351 A.U., respectively in without and with CCCP) (Figure 58D). In 5 of the 6 neoplastic individuals analyzed, ROS production was even higher with CCCP than without CCCP (data not shown).

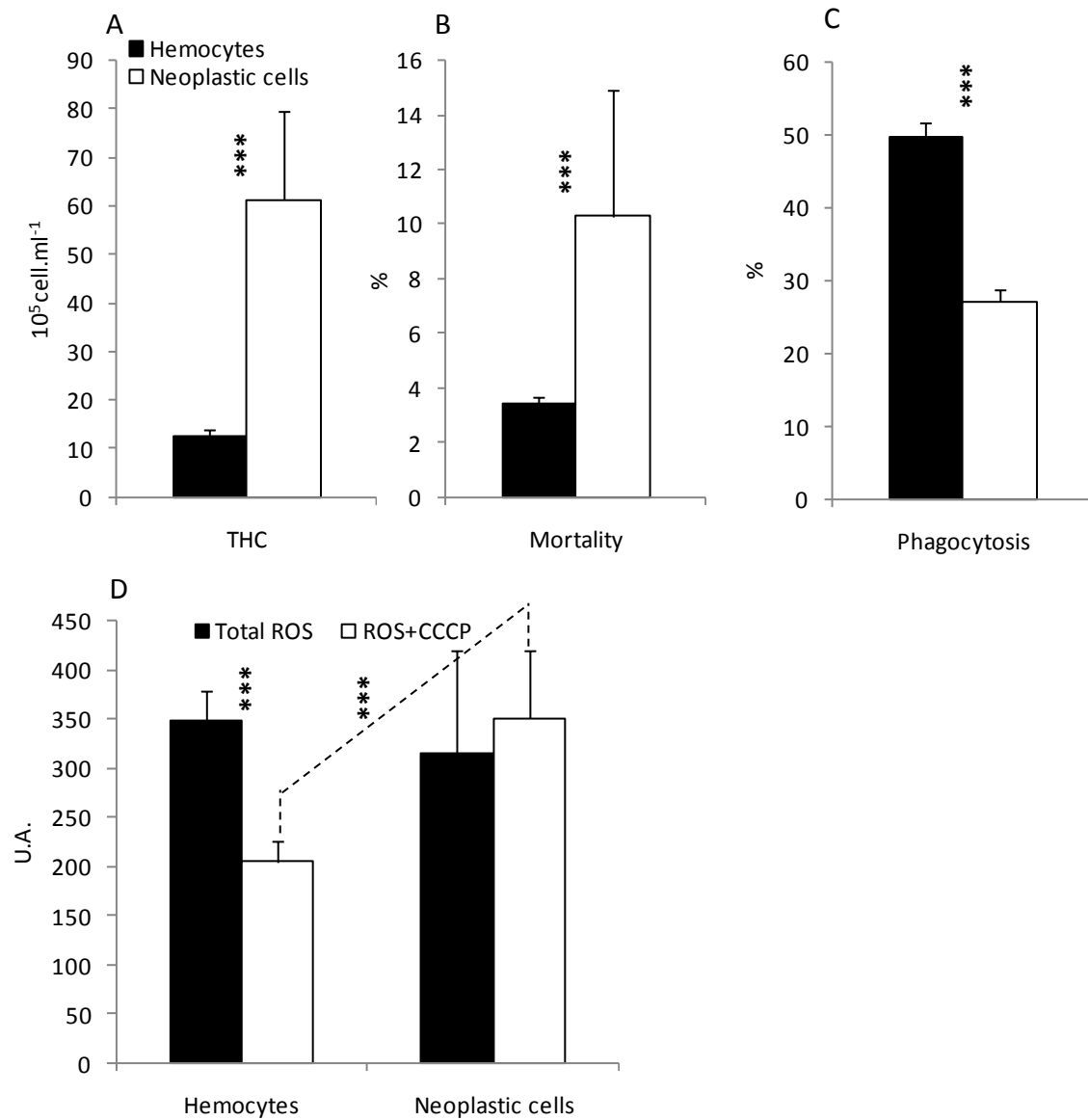


Figure 58: A: Total hemocytes count (THC) expressed in  $10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ . B: Percentage of mortality (%). C: Phagocytosis activity (%). D: Reactive oxygen species (ROS) production, expressed in arbitrary units (U.A.). E: CCCP-induced ROS production inhibition (%). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error ( $n = 19$  for hemocytes,  $n = 6$  for neoplastic cells). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

## Discussion

In hemolymph from highly diseased animals, neoplastic cells almost totally replace normal hemocytes which are known to play key role in many functions and particularly in immune bivalve defenses (Cheng, 1996; Chu, 2000). This pathological condition often leads to individual death (Elston et al., 1992; Barber, 2004). This death phenomenon is principally thought to be a consequence of (i), generalized hypoxia induced by high density of circulating cells in hemolymph and/or (ii) altered functions of hemolymph circulating cells (Barber, 2004). Considering these issues, some cellular functions and structural characteristics of normal hemocytes from healthy cockles and neoplastic cells from cockles affected by disseminated neoplasia were investigated and compared.

### ***Cell functions and morphology***

#### ***Cell proliferation in diseased cockles***

In the present study, total hemocyte count (THC) was observed to be near than 5 times higher in neoplastic cockles than in healthy cockles. Some cockles contained up to  $10 \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ . This reflects the main characteristic of cancerous cells, known to reveal abnormal and uncontrolled proliferation (Sherr, 1996; Evan and Vousden, 2001). This is coherent with our earlier observation on neoplastic cockles collected from the same area, revealing a high frequency of mitotic figures in nucleus, which indicates a high mitosis rate (Le Grand et al., 2010).

#### ***Reduced phagocytosis in diseased cockles***

Neoplastic cells presented an almost two times lower phagocytic activity than normal hemocytes. Similar pattern was previously evidenced in neoplastic cells from *M. arenaria* which are unable to ingest yeast (Beckmann et al., 1992). Authors suggested that

inability of polymerization or depolymerization of actin filament could be implicated in observed phagocytic inability. The same hypothesis exists in mammals where capacity of phagocytosis depends on cell ability to move, and to extend pseudopodia, which requires a functioning cytoskeleton (May and Machesky, 2001; Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid, 2004). Cytoskeletal impairment may thus explain the lower phagocytosis ability observed in cockle neoplastic cells.

### ***Mortality level***

The higher mortality percentage in neoplastic cells than in hemocytes was rather surprising. Indeed, tumor cells are generally considered immortal as apoptosis is generally defective leading to fast proliferation of undifferentiated cells (Evan and Vousden, 2001; Brown and Attardi, 2005). However, some cancerous cell populations were also evidenced to exhibit enhanced apoptotic cell death (Liu et al., 2001). In this case, the cancer cell proliferation results from faster proliferation rate than mortality rate. Higher mortality percentage in cockle neoplastic cells suggests that they are less “resistant” than normal hemocytes, possibly revealing a difference of survival strategy. Normal hemocyte survival may rely on high resistance and adaptation capacity whereas neoplastic cells may rely on high division and proliferation rates. Neoplastic cells would therefore only be dedicated to growth and division, discarding other cellular functions such as phagocytosis. This is in agreement with undifferentiated characteristics of neoplastic cells, morphologically less complex than hemocyte ones (Elston et al., 1992; Barber, 2004).

### ***ROS sources and potential hypoxia in neoplastic cells***

Similar global cell ROS production observed in cockle neoplastic cells and normal hemocytes was unexpected as ROS production is generally higher in cancerous cells (Storz, 2005; Halliwell, 2007). Although the origin of additional ROS in cancer cells is still unclear, the particular importance of non-mitochondrial ROS through the action of NADPH oxydase was suggested (Arnold et al., 2001; Kumar et al., 2008). It is possible that higher non-

mitochondrial ROS generation occurred in cockle neoplastic cells than in normal hemocytes, but that other process masked or attenuated the expected cancer-related higher ROS generation. Indeed, it clearly appeared that neoplastic and normal cells responded very differently upon exposure to CCCP, a chemical uncoupler of mitochondrial membrane potential, thought to inhibit mitochondrial ROS production (Smiley et al., 1991; Salvioli et al., 1997). The addition of CCCP decreased ROS production in normal hemocytes whereas it enhanced it in neoplastic cells of some diseased cockles. Such phenomenon could be related to the observation that addition of CCCP in “normal” mitochondria decreases mitochondrial ROS generation whereas it enhances it in inhibited mitochondria (Brookes, 2005). Beside this specific phenomenon, the present results suggest that non-mitochondrial ROS production may be enhanced in neoplastic cells, whereas mitochondrial source is inhibited. Origin of such differences upon CCCP exposure is still unclear but may reflect different hypoxic conditions in the hemolymph of heavily diseased cockles because of excessive cell concentrations. Indeed, hemolymph from *Mya arenaria* presenting advanced stages of disseminated neoplasia and containing neoplastic cells in very high density, were found to present significantly lower oxygen levels than hemolymph from healthy bivalves (Sunila, 1991). As hypoxia can cause an increase of oxidative stress by enhanced ROS production in mitochondria (Kim et al., 2006; Poyton et al., 2009), cells are thought to deploy some mechanisms to reduce ROS production. Hypoxia inducible factor (HIF) decreases the activity of the pyruvate deshydrogenase, an enzyme allowing the transformation of pyruvate in acetylCoA, decreasing use of acetylCoA in the Krebs cycle, to finally decrease generation of mitochondrial oxidative phosphorylation substrates such as NADH and by-products such as ROS (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). In cockle neoplastic cells, hypoxia, through the activation of HIF, could explain the above suggested modulation of mitochondrial ROS production.



### ***PL quantity/cell and PL quantity/membrane surface***

The higher quantity of total PL, observed in neoplastic cells when compared to hemocytes, can be related to a metabolism modification occurring in cancerous cells. Indeed, anabolic reactions related to cell growth and proliferation are stimulated in tumor cells, and particularly FA and PL synthesis (Menendez and Lupu, 2007; Brusselmans and Swinnen, 2008; Kroemer and Pouyssegur, 2008). Also, as PL are the main components of cell membranes, the higher PL quantity in neoplastic cell than in hemocytes may simply reflect the fact that neoplastic cells have larger cell and nucleus sizes than normal hemocytes (Le Grand et al., 2010). Indeed, microscopic observations of *C. edule* hemocytes and neoplastic cells allowed the determination of cell and nucleus mean diameters (data not shown). The resulting estimation of cell membrane surface, taking into account plasma and nuclear membranes, allowed estimating membrane surface of neoplastic cells at about 2.6 times higher than the one of normal hemocytes. The quantity of PL being 2.4 times higher in neoplastic cells than in hemocytes, the quantity of PL relative to membrane surface appeared similar between both cell types.

### ***Plasmalogen proportion***

Proportion of plasmalogens in membrane PL was markedly lower in neoplastic cells than in normal hemocytes. Considering this, two main hypotheses can be formulated in neoplastic cells: (i) rate of plasmalogen synthesis is lower compared to diacyl+alkyl forms and CAEP and/or (ii) plasmalogens are specifically degraded.

#### ***(i) Plasmalogen synthesis rate***

The first hypothesis of lower ability or rate of plasmalogen synthesis can be linked to (i) a lower availability of the substrates and/or (ii) a lower activity or quantity of the enzymes implicated in plasmalogen biosynthesis. The biosynthesis pathway of ether PL such as plasmalogens and alkyl-acylPL starts in peroxisomes, through the action of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT) and alkyl-dihydroxyacetone

phosphate synthase (ADHAP-S) and leads to the synthesis of 1-alkylDHAP (Nagan and Zoeller, 2001; Brites et al., 2004). All the subsequent reactions occur in cytoplasm and endoplasmic reticulum, leading to the formation of 1-alkyl-2-acylPE, following the same pathways than those of the 1-2-diacylPE biosynthesis. The final step in plasmalogen biosynthesis consists in the desaturation of the *sn*-1 ether bond by a  $\Delta$ 1-desaturase 1-alkyl-2-acylPE specific, which leads to the formation of 1-alkenyl-2-acylPE (PEplsm). PCplsm and PSplsm are thought to be formed from this PEplsm, through polar head exchange (Paltauf, 1983a).

DHAP is unlikely a putative limiting factor to plasmalogen biosynthesis as DHAP is a by-product of glycolysis generally enhanced in cancer cells (Kim and Dang, 2006; Kroemer and Pouyssegur, 2008). Therefore, low activities or quantities of DHAP-AT, ADHAP-S and/or  $\Delta$ 1-desaturase may result in a low plasmalogen biosynthesis rate in neoplastic cells. Absence, inactivation or mislocalization of DHAP-AT and DHAP-S have been involved in several plasmalogen deficiency diseases such as Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata, while diacylPL synthesis remains unaffected (Zoeller et al., 1992; Nagan et al., 1998). On the other hand, results of James et al. (1997) suggested that the acylation of DHAP by DHAP-AT could be also important for 1-2-diacylPL synthesis. Thus, lower ADHAP-S activity would be the most probable enzymatic process implicated in potential lower ether PL synthesis in neoplastic cells from cockles.

#### *(ii) Plasmalogen degradation*

Concomitant to lower plasmalogen biosynthesis, an additional mechanism to explain lower proportion of plasmalogen in neoplastic cell membranes is a higher and selective degradation of plasmalogens. Plasmalogen degradation can occur chemically, mainly by ROS oxydation, or enzymatically, through phospholipase A<sub>2</sub> action.

- Plasmalogen degradation by ROS

*In vitro*, as well as a recent *in vivo* studies, indicated that the vinyl-ether bond of plasmalogens is highly susceptible to oxidative cleavage and rapidly reacts with and trap singlet oxygen, free-radicals and other ROS, delaying and protecting thus the oxidation of the PUFA double bonds of other surrounding molecules (Leray et al., 2002; Kuczynski and Reo, 2006; Leßig and Fuchs, 2009). Plasmalogens decline in some tissues upon normal aging but also upon increase oxidative stress in some pathological conditions (Leßig and Fuchs, 2009). For example, decrease of PEplsm level is used to diagnose ovarian cancer which is the consequence of severe oxidative stress (Shan and Davis, 2006). In this type of cancer, the observed decrease of plasmalogens levels was hypothesized to reflect a degradation of these molecules upon increased oxidative stress.

It is possible to hypothesize a similar mechanism in disseminated neoplasia affecting cockles from Arcachon Bay. Although total production of ROS did not directly increase, the use of CCCP allowed to evidence that ROS production mechanisms differed in diseased cockles, when compared to normal hemocytes: mitochondrial ROS production was hypothesized to be inhibited while other non-mitochondrial was enhanced. Therefore, it is possible to think that different cell localization and misbalance of ROS in neoplastic cells may lead to a higher oxidative stress in these cells, resulting in higher plasmalogen degradation than synthesis and to subsequently lower proportion of plasmalogen in neoplastic cells than in hemocytes. In presence of ROS, plasmalogen oxidation leads to the release of various classes of saturated *sn*-1 aldehydes and of 1-lyso-2acyl-PL, being rapidly transformed, for example for aldehydes, to their corresponding FA (Morand et al., 1988; Stadelmann-Ingrand et al., 2001). Although by-products of plasmalogen oxidation were not measured, the higher SFA and free FA proportions in neutral lipids from neoplastic cells could reinforce the hypothesis of plasmalogen degradation by ROS.

*- Plasmalogen degradation by phospholipase A<sub>2</sub>*

Observed differences in membrane lipid composition of neoplastic cells could also be explained by hypoxia induced by their massive proliferation, as discussed above. In rabbit proximal tubules, hypoxia was found to stimulate the activity of particular phospholipase A<sub>2</sub> (Portilla and Creer, 1995). This enzyme specifically hydrolyses the *sn*-2 ester linkage of plasmalogens. Such a mechanism could explain the reduction of plasmalogen proportions in cockle neoplastic cells. The plasmalogen specific phospholipase A<sub>2</sub> could also have a particular importance in observed lower proportions of NMI FA in plasmalogens of neoplastic cells. Indeed, this enzyme was found in mammals, under hypoxic conditions, to selectively hydrolyze the *sn*-2 ester bond of PEplsm and PCplsm linked to their specifically associated FA, namely 20:4n-6 (Portilla and Creer, 1995). In cockle neoplastic cells, it is speculated that, in a same way, plasmalogens specifically associated to NMI FA would preferentially be hydrolyzed by a phospholipase A<sub>2</sub>, leading to a lower proportion of these particular FA in plasmalogens.

***NMI-associated plasmalogen proportions***

*NMI synthesis*

In plasmalogens (particularly PEplsm and PSplsm), but also in total polar lipids, the proportion of NMI FA was drastically lowered in neoplastic cells. NMI FA present the particularity to be the only long chain PUFA that bivalves can synthesize *de novo* (Zhukova, 1986; 1991). Moreover, these particular FA were recently shown to be specifically associated to plasmalogens, suggesting particular functional and/or physiological roles of these molecular species (Kraffe et al., 2004). Therefore, reduction of NMI proportions in plasmalogens may have some detrimental effects on cell functioning. Also, it can be speculated that a lower synthesis rate of NMI in neoplastic cells could be another limiting

factor for the previously hypothesized reduction of plasmalogens synthesis in neoplastic cells.

#### *Degradation by ROS*

As plasmalogens, NMI were also thought to be implicated in the cellular responses against oxidative stress (Irazu et al., 1984; Zakhartsev et al., 1998; Barnathan, 2009). Indeed, due to the particular position of their double bonds, spaced by more than one methyl group, these FA would be less sensitive to oxidation than FA displaying same number of insaturations. In a similar way, 20:1n-11, also suggested to be of endogenous origin and to have particular functional roles because of its specific association with plasmalogens (Kraffe et al., 2004). Only one double bond is expected to be less sensitive to oxidation than PUFA (Halliwell, 1999). It is therefore possible to hypothesize that among plasmalogens, molecular species containing 20:1n-11 or NMI FA would play as preferential antioxidant, by targeting ROS selective oxidation to their vinyl-ether linkage. The lower proportions of plasmalogens linked to NMI and 20:1n-11 in neoplastic cells would be thus explained by their preferential oxidation upon oxidative stress in diseased cells.

#### *Differentiation of neoplastic cells and role of plasmalogens and their specific FA composition*

Considering their morphological characteristics and their cellular functions, it appeared that neoplastic cells were far less differentiated than normal hemocytes. We previously hypothesize that these cells discarded most of the mechanisms implicated in their resistance or adaptation, their survival mainly relying on their capacity to growth and to divide faster. For this, neoplastic cells have to newly form membranes through PL synthesis. Differences in membrane lipid composition that occurred between neoplastic cells and hemocytes mainly concerned *de novo* biosynthesized molecules such as plasmalogens, NMI FA and 20:1n-11, thought to play important roles in hemocyte functions (Le Grand et al., submitted). Therefore, considering modified functions of neoplastic cells, the presence of

plasmalogens and NMI FA/20:1n-11 in their membranes may not be as crucial as for normal hemocytes. One example could concern the lower phagocytosis ability found for neoplastic cells. Indeed, PEplsm was proposed to easier mechanisms such as membrane fusion (Glaser and Gross, 1994) in relation to its propensity to adopt non lamellar ( $H_{II}$ ) conformation (Lohner, 1996). The lower PEplsm content observed in neoplastic cells may explain, at least partially, this low phagocytosis ability found for these cells.

### **Conclusion**

The present study evidenced circulating cells structural and functional changes linked to neoplasia. Indeed, plasmalogens, and particularly NMI FA-plasmalogen molecular species were found in marked lower proportions in neoplastic cells. Three main mechanisms were hypothesized to explain lower proportions of plasmalogens, and particularly NMI FA-plasmalogen molecular species in neoplastic cells: (i) lower synthesis and/or (ii) higher degradation (ROS, phospholipase  $A_2$  for example) of these molecules and/or (iii) cell dedifferentiation. In neoplastic cells, these lipid structure modifications were observed concomitantly to global changes of descriptive and functional cell parameters such as cell proliferation, higher mortality percentage, lower phagocytosis activity and modification or ROS production source. These findings suggest therefore a link between membrane lipid composition of hemolymph circulating cells and their functions, and highlight the crucial importance of NMI (and 20:1n-11) plasmalogen molecular species in cell functions. However it is not possible to determine which of the modifications origins the other (i) between the structuro-functional changes and neoplasia or (ii) between the structural and functional changes. Studying neoplastic cells from cockles presenting intermediate development stage of disseminated neoplasia could ease the elucidation of these points.

However, lower plasmalogen proportions found in neoplastic cells of diseased cockles from Arcachon Bay is at the opposite to what is described in some mammal cancerous cells in which both alkyl and alkenyl forms of lipids increase (Snyder and Wood, 1968; 1969; Howard et al., 1972; Ruggieri et al., 1999; Fallani et al., 2006). It is important to

keep in mind that in the present study, plasmalogens were investigated as a pure fraction whereas alkylacylPL were analyzed together with diacylPL in the diacyl+alkyl fraction. This asked therefore the question of possible higher proportions of alkylacylPL in neoplastic cells. The analysis of alkylacylPL as an isolated fraction could represent a further step in the comprehension of mechanisms leading to membrane lipid composition modification of circulating cells in relation with disseminated neoplasia disease.

### **Acknowledgments**

This work was supported by a grant from Région Bretagne to Fabienne Le Grand. Authors thank the team from Arcachon including Xavier de Montaudouin and Ika Paul-Pont for their valuable help on the field and for sharing their laboratory where flow cytometric analyses were conducted.





### **3 EFFET DE LA NEOPLASIE DISSEMINEE SUR LES COMPOSITIONS LIPIDIQUES MEMBRANAIRES ET LES FONCTIONS CELLULAIRES DES HEMOCYTES DE MYE (MYA ARENARIA)**

D'une manière similaire à ce qui a été présenté pour la coque *Cerastoderma edule*, la présente étude a consisté à déterminer l'effet de la néoplasie disséminée sur les paramètres fonctionnels et la composition lipidique membranaire des cellules de l'hémolymph de myes *Mya arenaria*.

---

## 3.1 RESULTATS

---

### 3.1.1 COMPOSITION LIPIDIQUE

#### 3.1.1.1 COMPOSITION LIPIDIQUE GLOBALE

---

La quantité totale de phospholipides tend à être plus forte dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes de myes, mais la différence n'est cependant pas significative ( $8.4 \text{ nmoles} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$  et  $6.8 \text{ nmoles} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$ , respectivement) (Figure 59A). Il en est de même pour les stérols ( $5.7 \text{ nmoles} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$  pour les cellules néoplasiques et  $5.3 \text{ nmoles} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$  pour les hémocytes). En conséquence, les pourcentages de stérols dans les membranes cellulaires sont similaires dans les deux types de cellules ( $46.7 \pm 10.1\%$  et  $39.2 \pm 7.6\%$ , respectivement pour les cellules néoplasiques et les hémocytes). Par contre, la quantité de lipides neutres totaux présente une sévère diminution, d'un facteur 1.8, dans les cellules néoplasiques, en comparaison avec les hémocytes normaux ( $2.2 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$  et  $4.1 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ cellules}$ , respectivement) (Figure 59B).

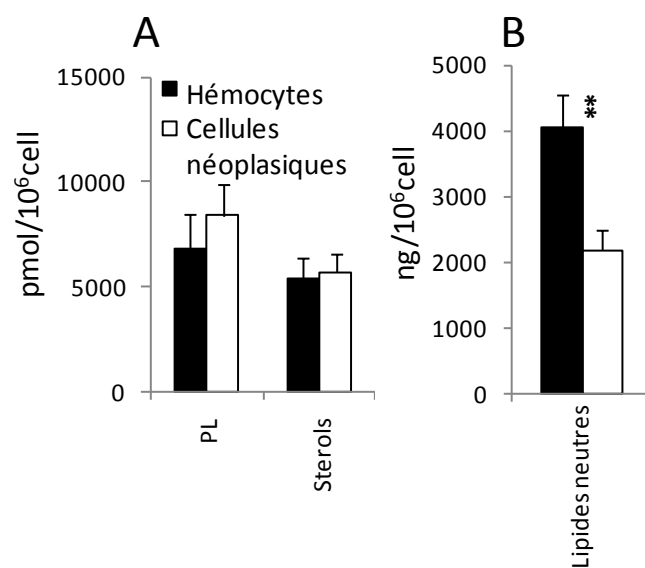


Figure 59: A : Quantités de phospholipides (PL) et de stérols, exprimées en pmol.10<sup>-6</sup>cellules. B : Quantités de lipides neutres, exprimées en ng.10<sup>-6</sup>cellules. Moyenne  $\pm$  erreur standard (n=3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*).

### 3.1.1.2 COMPOSITION EN CLASSES ET SOUS-CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

---

La composition en classes et sous-classes de phospholipides des cellules néoplasiques présente quelques différences par rapport à celle des hémocytes (Figure 60A). En effet, deux classes présentent des variations significatives entre ces deux types cellulaires : la PE<sub>diacyl+alkyl</sub> qui est présente en plus grande proportion dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes, alors que c'est l'inverse pour la PS<sub>diacyl+alkyl</sub> (7.2% et 5.3% pour la PE<sub>diacyl+alkyl</sub> et 2.4% et 6.4% pour la PS<sub>diacyl+alkyl</sub>, respectivement dans les cellules néoplasiques et les hémocytes). Les classes majoritaires (PC<sub>diacyl+alkyl</sub>, PE<sub>plsm</sub> et CAEP) présentent des proportions quasiment identiques (21.9% et 20.0% pour PC<sub>diacyl+alkyl</sub>, 23.1% et 22.8% pour PE<sub>plsm</sub> et 20.6% et 21.1% pour CAEP, respectivement dans les cellules néoplasiques et les hémocytes). Il en est de même pour les autres classes de phospholipides. En conséquence, les proportions de plasmalogènes dans les phospholipides totaux, ainsi que dans PC, PE et PS, ne présentent pas non plus de différences entre hémocytes normaux et cellules néoplasiques (Figure 60B).

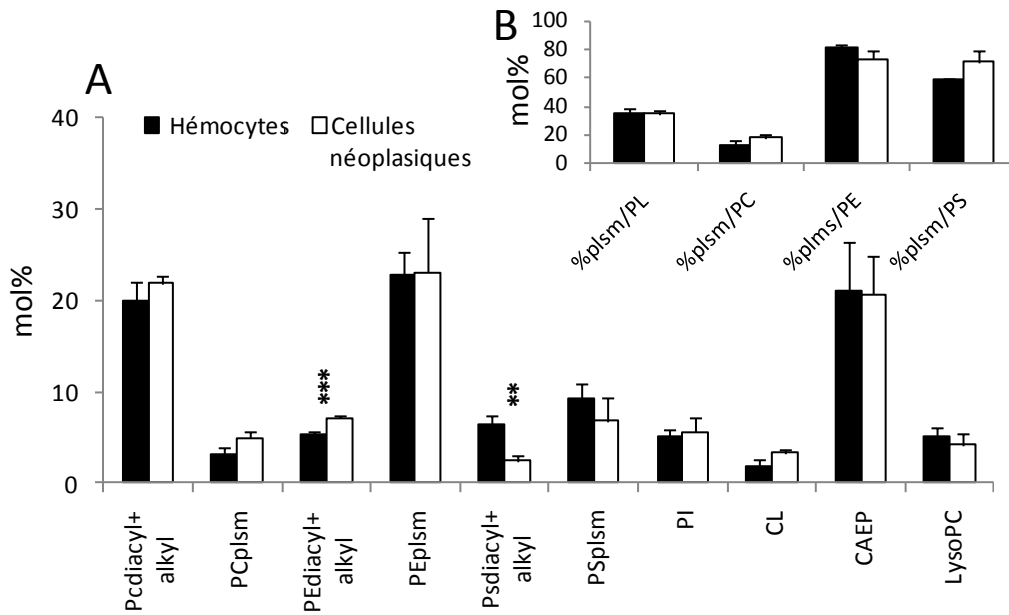


Figure 60: A : Composition en classes et sous-classes de phospholipides (PL). B : Pourcentage de plasmalogènes parmi les PL totaux et parmi PC, PE et PS. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des PL totaux (A, B) ou d'une classe de PL (B). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*) .

### 3.1.1.3 COMPOSITION EN CLASSES DE LIPIDES NEUTRES

La composition en classes et sous-classes de lipides neutres des cellules néoplasiques présente quelques différences par rapport à celle des hémocytes (Figure 61). En effet, la proportion de triacylglycérides est significativement plus faible dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes (44.8% et 58.1%, respectivement dans les cellules néoplasiques et les hémocytes). Cette diminution semble être concomitante à une augmentation non significative de la proportion d'acides gras libres (20.4 % et 10.7%, respectivement dans les cellules néoplasiques et les hémocytes).

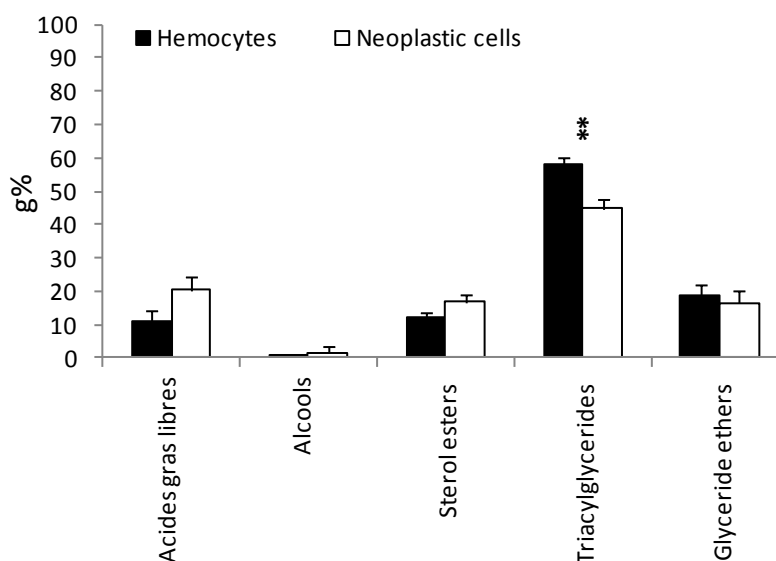


Figure 61: Composition en classes de lipides neutres. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard ( $n=3$ ), exprimées en g% des lipides neutres totaux. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*).

#### 3.1.1.4 COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES CLASSES ET SOUS-CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES

---

##### CL, PI, CAEP ET LYSOPC

---

Aucune différence significative majeure n'a été mise en évidence en comparant les compositions en acides gras de la PI, de la LysoPC, du CL et du CAEP entre des hémocytes et des cellules néoplasiques de myes *Mya arenaria* (Figure 62, Figure 63). En effet, les compositions en acides gras de la PI et du CL sont similaires entre les deux types cellulaires. La LysoPC ne présente pas non plus de différence significative. Cependant, comme observé pour la PI, mais de manière plus prononcée, les cellules néoplasiques tendent à présenter une LysoPC plus saturée (66.4% de AGS contre 53.9% dans les hémocytes), majoritairement en raison d'un contenu plus élevé en 16:0 (34.0% de AGS contre 26.9% dans les hémocytes) et en 18:0 (16.1% de AGS contre 10.4% dans les hémocytes). Bien que le CAEP des cellules néoplasiques présente lui aussi une composition très similaire à celui des hémocytes, une proportion significativement plus faible d'acides gras branchés a été mise en évidence dans les cellules néoplasiques, 12.8% contre 19.8% dans les hémocytes. Cette diminution est compensée par une augmentation non significative des niveaux de 14:0, 4.5% de AGS contre 1.6% dans les hémocytes et de 18:0, 9.6% de AGS contre 6.0% dans les hémocytes.

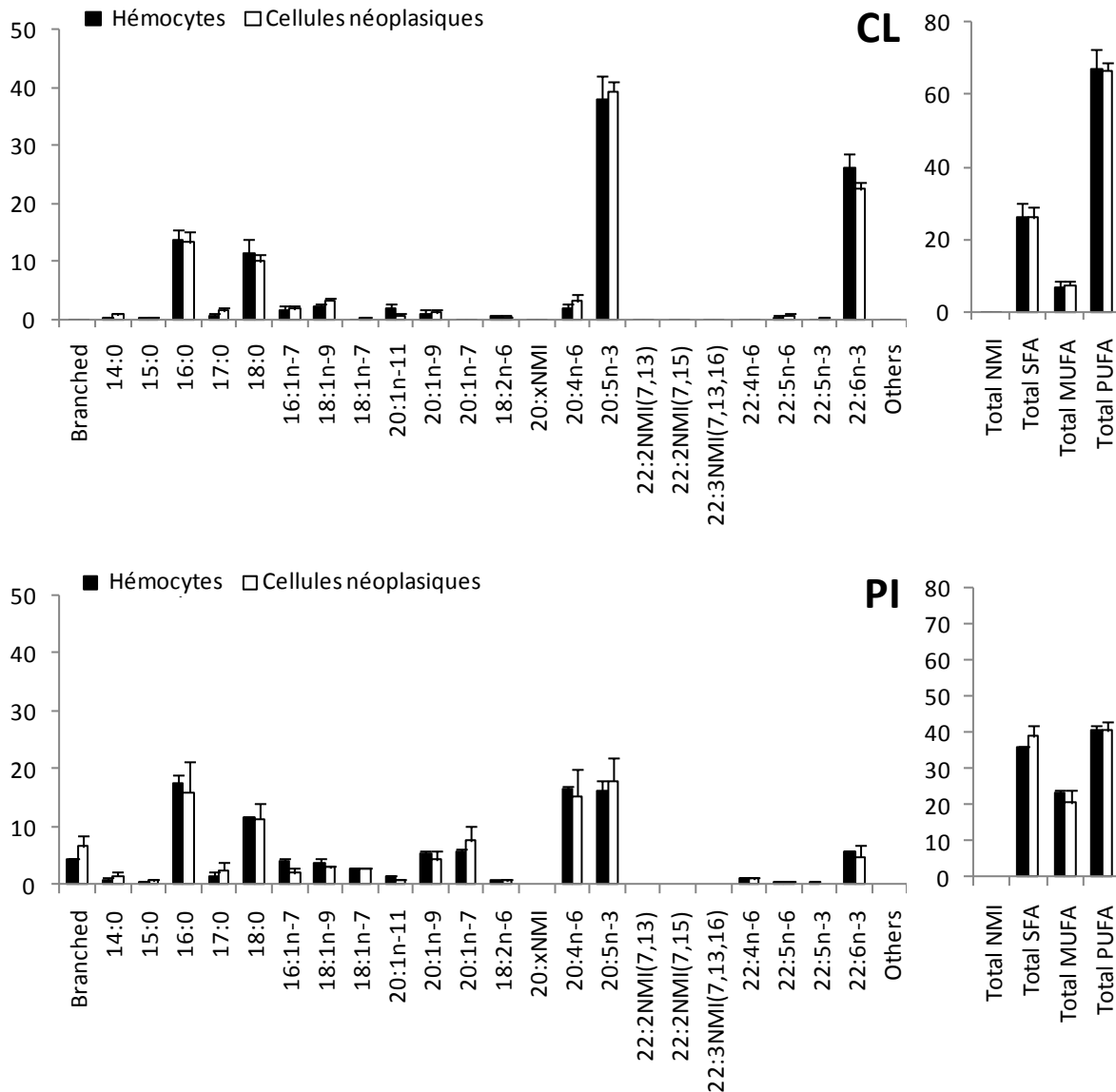


Figure 62: Composition en acides gras du CL et de la PI. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20:xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).



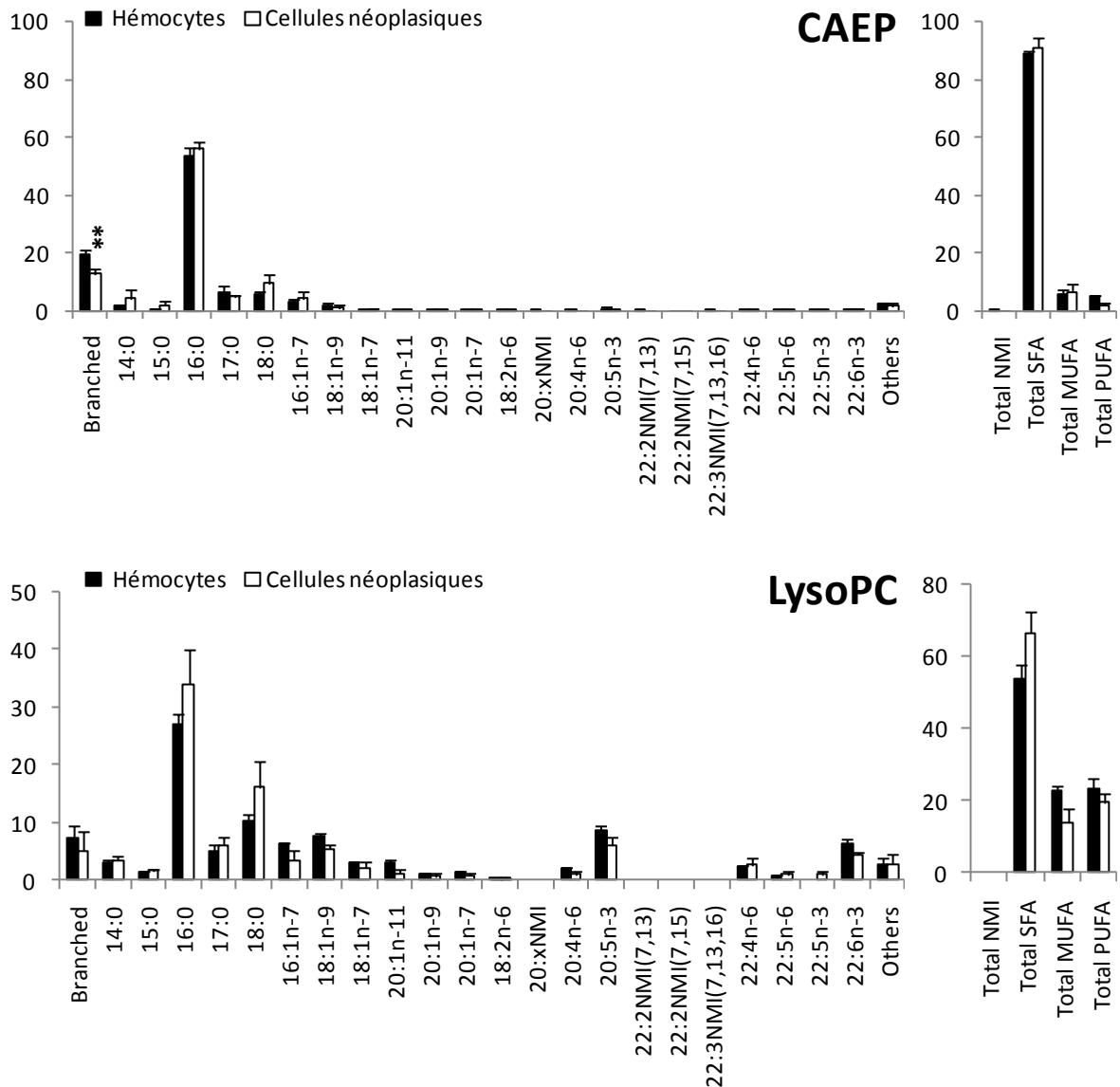


Figure 63: Composition en acides gras du CAEP et de la LysoPC. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20:xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion  $<1.0\%$  (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

## SOUS-CLASSES DIACYL+ALKYL

---

Les compositions en acides gras de la PCdiacyl+alkyl et de la PEdiacyl+alkyl sont semblables quel que soit le type cellulaire considéré (Figure 64). Seules quelques faibles différences significatives sont observées. Ainsi, les proportions de certains AGMI, tels les 18:1n-9, 20:1n-11 et 20:1n-7, ont été retrouvées significativement plus élevées dans la PCdiacyl+alkyl des cellules néoplasiques que dans les hémocytes. L'inverse est observé pour le 18:1n-9, le 20:1n-11 et le 20:1n-9 dans la PEdiacyl+alkyl. Il en résulte une proportion totale d'AGMI significativement inférieure dans les cellules néoplasiques, en comparaison avec celle des hémocytes, pour cette sous-classe (13.0% et 15.6%, respectivement dans les cellules néoplasiques et dans les hémocytes). Par contre, la proportion de 20:4n-6 est significativement plus faible dans la PCdiacyl+alkyl et la PEdiacyl+alkyl des cellules néoplasiques, mais ces différences restent faibles.

Dans la PSdiacyl+alkyl, une seule différence significative a été observée (Figure 64). Il s'agit d'une proportion de 22:5n-3 6.2 fois plus élevée dans les cellules néoplasiques (3.1% et 0.5%, dans les cellules néoplasiques et les hémocytes respectivement). La même tendance a été également observée dans la PCdiacyl+alkyl, mais dans une moindre mesure (1.8% et 1.2%, dans les cellules néoplasiques et les hémocytes respectivement). Au contraire, dans la PSdiacyl+alkyl, comme dans la PCdiacyl+alkyl et la PEdiacyl+alkyl, la proportion de 20:4n-6 tend à être plus faible dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes (1.9% et 3.0%, dans les cellules néoplasiques et les hémocytes respectivement). Cette même tendance est également observée pour le 20:5n-3 (9.7% et 14.0%, dans les cellules néoplasiques et dans les hémocytes respectivement) et le 22:5n-6 (0.7% et 2.2%, respectivement dans les cellules néoplasiques et dans les hémocytes). Ainsi, la proportion de AGPI dans la PSdiacyl+alkyl des cellules néoplasiques tend à être inférieure à celle des hémocytes (31.4% et 36.5%, respectivement), contrairement à celle de AGS (48.3% et 42.7, respectivement).

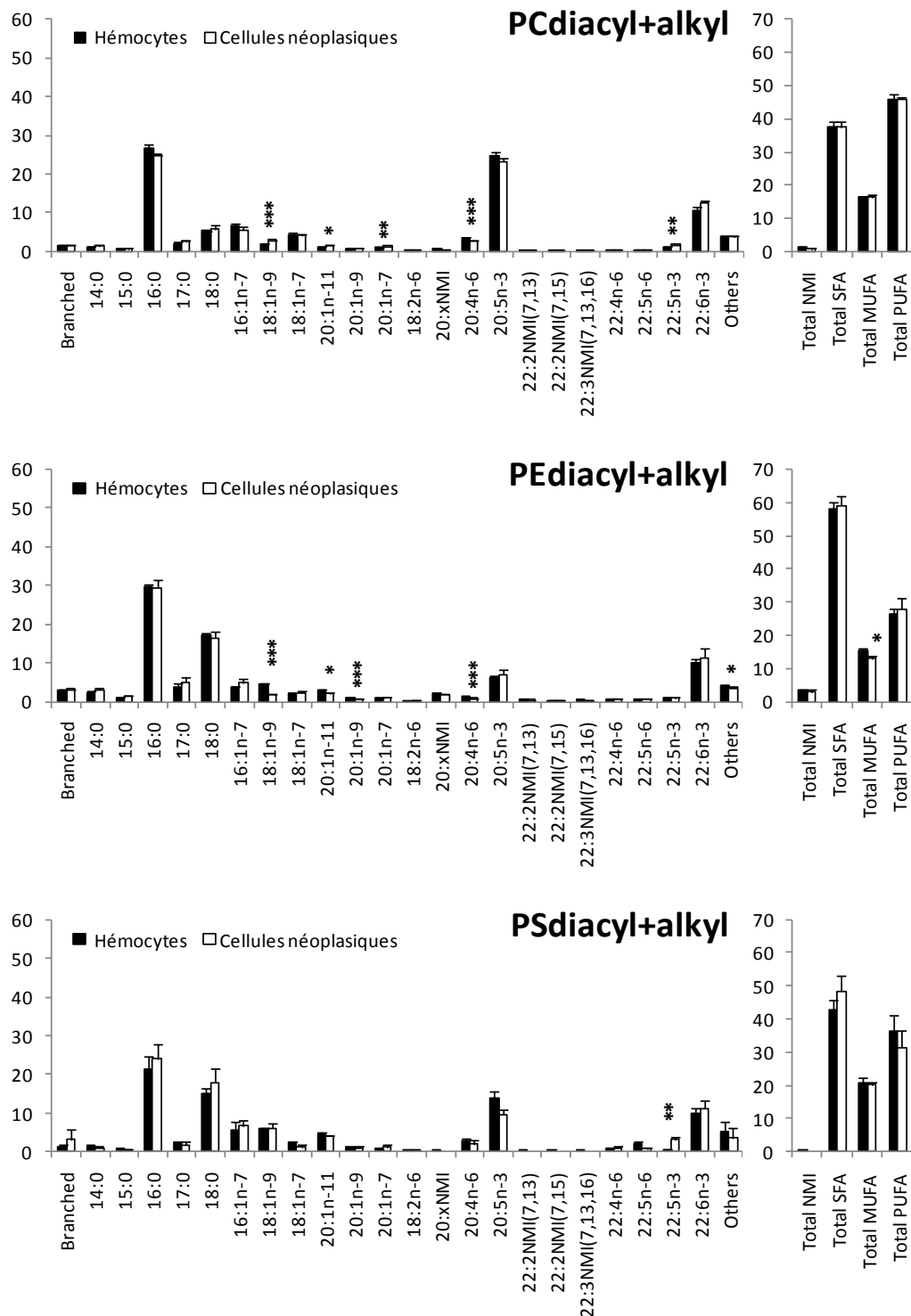


Figure 64: Composition en acides gras des fractions diacyl+alkyl de la PC, de la PE et de la PS. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20:xNMI: principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*)

## SOUS-CLASSES PLASMALOGENES

---

La PCplsm présente une composition en acides gras relativement similaire entre et les cellules néoplasiques les hémocytes de mye (Figure 65). Seule la proportion de 18:1n-9 s'est trouvée être significativement différente entre ces deux types de cellules (1.4% et 3.2%, dans les cellules néoplasiques et les hémocytes respectivement). D'autres tendances, non significatives, peuvent cependant être signalées. Il s'agit par exemple de niveaux inférieurs d'acides gras branchés et de 22:4n-6 et de plus fortes proportions de 20:5n-3 dans les cellules néoplasiques.

La PEplsm et la PSplsm sont les sous-classes dont les compositions en acides gras varient le plus avec la néoplasie disséminée (Figure 65). Dans les deux sous-classes, les grands traits de ces variations sont une proportion d'AGMI plus faible dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes (15.1% et 18.1% dans la PEplsm et 13.9% et 20.5% dans la PSplsm, respectivement) et une proportion de AGS plus forte (14.0% et 5.8% dans la PEplsm et 24.5% et 21.2% dans la PSplsm, respectivement). La proportion de AGPI, elle, est supérieure dans les cellules néoplasiques dans le cas de la PSplsm mais tend à être inférieure dans celui de la PEplsm (20.8% et 26.1% dans la PEplsm et 11.6% et 8.3% dans la PSplsm, respectivement pour les cellules néoplasiques et les hémocytes). Ces variations sont particulièrement dues aux AGPI n-3 incluant le 20:5n-3, le 22:5n-3 et le 22:6n-3.

Dans la PEplsm, la plus faible proportion d'AGMI observée dans les cellules néoplasiques est principalement liée à des proportions significativement inférieures de 18:1n-9 et de 20:1n-7 (1.1% et 2.6% pour le 18:1n-9 et 1.9% et 3.3% pour le 20:1n-7, respectivement) (Figure 65). Dans la PSplsm, cette diminution est le résultat d'une diminution d'un facteur 2.5 de la proportion de l'acide gras majoritaire dans cette sous-classe, le 20:1n-11 (5.2% et 13.1%, respectivement pour les cellules néoplasiques et les hémocytes).

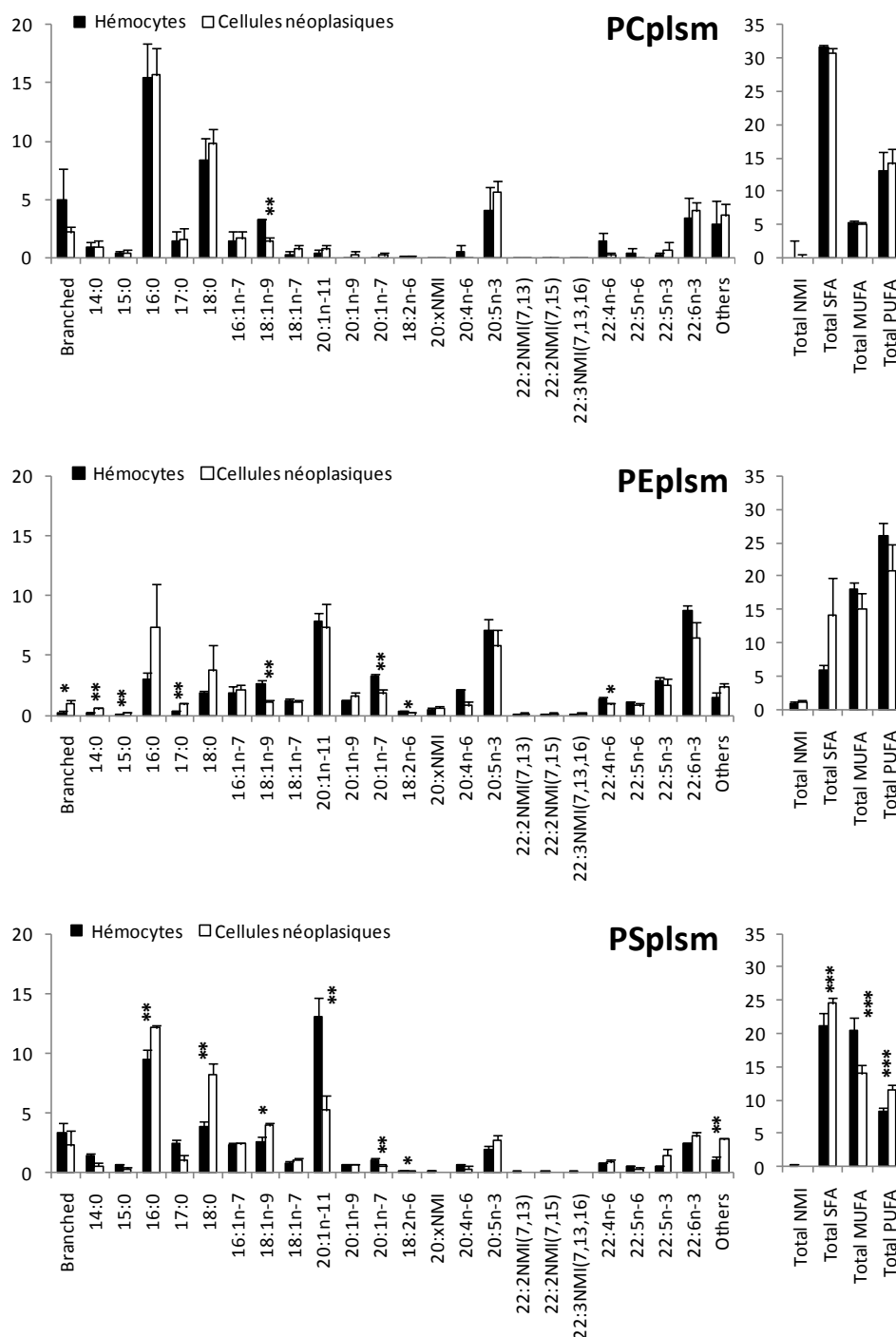


Figure 65: Composition en acides gras des fractions plasmalogènes de la PC, de la PE et de la PS. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20:xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). Le pourcentage total d'acides gras sn-2 a été ajustée à 50% afin de prendre en compte la chaîne alkényle sn-1 hydrolysée par la phase acide mobile lors de la séparation des sous-classes.

### 3.1.2 PLASMALOGÈNES ET 20:1N-11

La proportion de 20:1n-11 par rapport aux AG totaux est significativement plus faible dans les cellules néoplasiques que dans les hémocytes (3.6% et 5.7%, respectivement) (Figure 66A). Ces valeurs plus faibles sont retrouvées de manière similaire que l'on considère la proportion d'espèces moléculaires de plasmalogènes associés au 20:1n-11 par rapport aux PL totaux (3.7% et 6.1%, respectivement) ou par rapport aux plasmalogènes totaux (10.9% et 17.0%, respectivement) (Figure 66B).

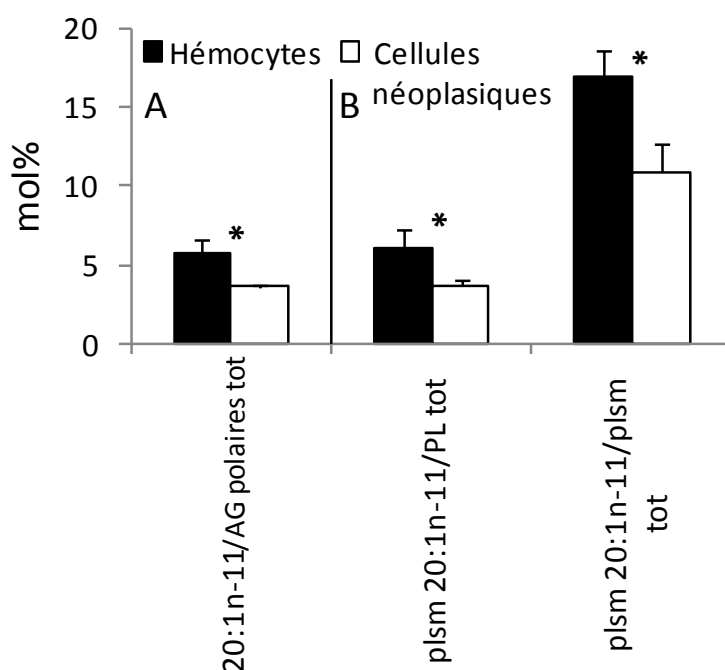


Figure 66: A : Proportions d'acides gras 20:1n-11 dans les acides gras polaires totaux. B : Proportions des espèces moléculaires plasmalogènes/20:1n-11 (plsm 20:1n-11), par rapport aux phospholipides totaux (/PL tot) et aux plasmalogènes totaux (/plsm tot). Moyenne  $\pm$  erreur standard (n=3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*) .

### 3.1.3 PARAMÈTRES FONCTIONNELS

La proportion de cellules phagocytiquement actives est significativement plus faible dans l'hémolymphe des individus néoplasiques que dans celle d'individus sains (10.9% et 16.5%, respectivement) (Figure 67A). Au contraire, la production totale d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ne varie pas significativement en fonction du type cellulaire étudié (262.4 U.A. et 295.0 U.A. dans les hémocytes et les cellules néoplasiques, respectivement) (Figure 67B).

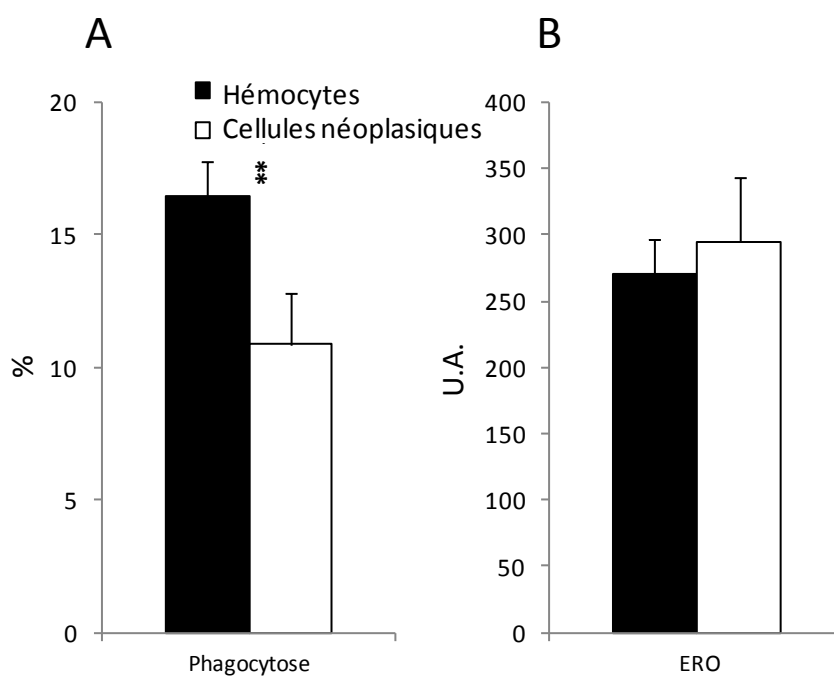


Figure 67: A : Capacité de phagocytose (%). D : Production de ERO (U.A.). Moyenne  $\pm$  erreur standard. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes (n=32) et les cellules néoplasiques (n=15) de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*).

## 3.2 DISCUSSION

Les résultats obtenus lors de la présente étude, visant à comparer la composition lipidique membranaire détaillée ainsi que des paramètres fonctionnels d'hémocytes et de cellules néoplasiques de myes (*Mya arenaria*) provenant de l'île du Prince Edouard (Canada), diffèrent de ce qui a pu être observé pour la coque (*Cerastoderma edule*) du bassin d'Arcachon. Ces différences concernent notamment les compositions lipidiques membranaires. En effet, chez la mye, la proportion de plasmalogènes est équivalente entre les hémocytes et les cellules néoplasiques, alors que chez la coque, cette proportion a été retrouvée deux fois plus faible dans les cellules néoplasiques. De plus, pour la plupart des classes et sous-classes de PL analysées, la composition en acide gras est similaire dans les deux types cellulaires chez la mye, alors que des variations significatives ont été observées chez la coque, notamment dans les sous-classes plasmalogènes.

Compte tenu de ce qui a été montré dans le chapitre précédent, concernant les caractéristiques de la néoplasie disséminée affectant les coques du bassin d'Arcachon et les myes de l'île du Prince Edouard, de telles différences ne sont pas surprenantes. En effet, les mécanismes menant à l'aneuploïdie des cellules de l'hémolymph se sont révélés différents entre les deux espèces, laissant suggérer l'existence de deux « types » différents de néoplasie. Chez la coque, ce mécanisme est apparu complexe, multiple et évoluant au cours du développement de la maladie, menant à une grande diversité de ploïdie des cellules néoplasiques, alors que chez la mye, ce mécanisme semble plus simple et constant puisque les cellules néoplasiques sont toutes tétraploïdes. D'une manière similaire, il est donc possible que chez ces deux espèces, les modifications lipidiques membranaires résultent de mécanismes différents.

La néoplasie disséminée affectant la mye présente d'autres différences avec celle affectant la coque, notamment en matière d'évolution de la concentration des cellules



circulantes et de la proportion des cellules néoplasiques dans l'hémolymph (voir le chapitre 2). En effet, les coques présentant un stade très avancé de la maladie (stade 3), déterminé grâce à la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymph (>75% de cellules néoplasiques dans l'hémolymph) présentaient une concentration totale de cellules dans l'hémolymph beaucoup plus élevée que celle observée chez des coques saines. Au contraire, cette concentration était du même ordre dans les myes saines et les myes de stade 3. Chez la mye, l'existence d'un quatrième stade de développement de la néoplasie disséminée, pourrait expliquer une telle observation. En effet, comme expliqué dans le chapitre 2, selon les cinq niveaux de développement de la néoplasie disséminée déterminés par Cooper et al. (1982), en fonction de la concentration en cellules néoplasiques de l'hémolymph, les individus analysés lors de la présente étude seraient au maximum de niveau 4 ( $<10^7$  cellules néoplasiques.mL<sup>-1</sup>) alors qu'un cinquième niveau existerait ( $>10^7$  cellules néoplasiques.mL<sup>-1</sup>). En suivant cette hypothèse, c'est le stade 4 des myes, et non pas le stade 3, qui correspondrait à un état très avancé de la maladie et donc au stade 3 des coques. Il est alors possible que les faibles différences observées chez les myes de stade 3, par rapport aux individus sains, ne soient que les prémices à des modifications plus marquées qui auraient lieu chez des individus de stade 4. Cela pourrait alors expliquer les modifications différentes de compositions lipidiques membranaires des cellules de l'hémolymph entre les deux espèces étudiées. Cependant, les cellules circulantes de ces myes néoplasiques de stade 3 présentent, de la même manière que ce qui a été observé dans le cas des coques, une activité phagocytaire réduite par rapport à celle des hémocytes.

Cependant, il est intéressant de remarquer que dans le cas de la mye, une sous-classe particulière présente tout de même un profil en acides gras très différent entre les hémocytes et les cellules néoplasiques. Il s'agit de la PSplsm où la proportion du 20:1n-11, acide gras majoritaire dans les hémocytes, est deux fois plus faible dans les cellules néoplasiques. Cet acide gras est spécifiquement associé aux plasmalogènes de myes. De la même manière, ce sont les plasmalogènes associés aux acides gras NMI qui présentent le plus de différences entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de coques. D'autre part,

ces molécules affectées par la néoplasie disséminée (NMI, 20:1n-11 et plasmalogènes) sont toutes biosynthétisées *de novo*, ou supposées pour le 20:1n-11 (Zhukova, 1986; 1991; Kraffe et al., 2004). Ainsi, le fait que ce soit précisément la proportion de l'espèce moléculaire 20:1n-11-plasmalogène chez la mye, et celle de NMI-plasmalogène chez la coque qui soient touchées dans les cellules néoplasiques pourrait, à tout le moins, confirmer une implication fonctionnelle identique du 20:1n-11 et des NMI en association avec les plasmalogènes. Cela pourrait aussi refléter quelques convergences de mécanismes entre les deux espèces, dans leurs réponses à la néoplasie.

Alors que chez la coque, les espèces moléculaires NMI-PEplsm et NMI-PSplsm semblaient être affectées de la même manière, chez la mye, ce sont plus particulièrement les espèces moléculaires 20:1-n11-PSplsm qui semblent l'être. Cela rejoint l'idée, émise dans le chapitre 1, d'une plus grande spécificité en acides gras de la PSplsm par rapport à la PEplsm, notamment vis-à-vis du 20:1n-11. Ainsi, chez la coque, les espèces moléculaires clés seraient les NMI-PSplsm mais également, les NMI-PEplsm alors que chez la mye, il s'agirait plutôt uniquement des 20:1n-11-PSplsm. L'existence d'un mécanisme qui toucherait les espèces moléculaires lipidiques les plus spécifiques pourrait en partie expliquer ce qui a été observé chez la coque et la mye. De plus, toujours en considérant l'hypothèse que les observations effectuées sur les coques représentent un stade plus avancé de la maladie par rapports à celles effectuées sur les myes, il serait possible d'imaginer que dans les premiers stades de développement de la pathologie, les espèces moléculaires les plus spécifiques seraient touchées, puis que dans des stades plus avancés, d'autres espèces moléculaires moins spécifiques le seraient. Cette hypothèse, pour être testée, nécessiterait l'étude des compositions lipidiques membranaires de cellules néoplasiques de myes de stade 4, présentant une forte prolifération cellulaire.

Dans le cas des coques, trois hypothèses majeures avaient été émises pour expliquer la faible proportion de plasmalogènes et en particulier d'espèces moléculaires NMI-plasmalogènes dans les membranes des cellules néoplasiques : une synthèse faible et/ou

une dégradation forte (ERO et/ou phospholipase A<sub>2</sub>) de ces molécules dans les cellules néoplasiques ou une dédifférenciation morpho-fonctionnelle des cellules. Dans le cas précis de la faible proportion de l'espèce moléculaire 20:1n-11-PSplsm dans les cellules néoplasiques de myes, l'hypothèse d'une synthèse plus faible de cette espèce moléculaire, uniquement, est peu probable. De plus, la PSplsm étant supposée être formée à partir de la PEplsm par échange de tête polaire (Paltauf, 1983a), la synthèse de la PSplsm est probablement étroitement liée à celle de PEplsm. Il en est de même pour l'hypothèse de dégradation importante de cette espèce moléculaire par les ERO. En effet, bien que cela n'ait pas été démontré, il paraît difficilement envisageable que la PSplsm soit plus sensible à l'oxydation que la PEplsm. Les effets des ERO sur l'espèce moléculaire 20:1n-11-PEplsm devraient être donc similaires à ceux sur l'espèce moléculaire 20:1n-11-PSplsm. Bien que la production de ERO totale soit équivalente, il est possible que la nature de ERO produit ou leur localisation diffère entre les deux types cellulaires. Des localisations sub-cellulaires différentes de la PSplsm et de la PEplsm, qui augmenteraient la concentration de ERO à proximité de la PSplsm mais pas de la PEplsm pourraient alors conforter cette hypothèse de dégradation sélective.

Une dédifférenciation morpho-fonctionnelle des cellules néoplasiques reste une autre hypothèse à considérer : les cellules néoplasiques seraient dédifférenciées. Plus précisément, elles auraient perdu leurs fonctions spécifiques et leur morphologie caractéristique. La capacité de phagocytose des cellules néoplasique, qui a été observée comme plus faible par rapport à celle des hémocytes, appuierait cette hypothèse. Dans ce cas, de part leur rôle morpho-fonctionnel supposé important dans les hémocytes, la synthèse des espèces moléculaires de 20:1n-11-PSplsm pourrait être inutile, et serait ainsi diminuée dans les cellules néoplasiques. Ce processus pourrait expliquer la baisse de la proportion de 20:1n-11-PSplsm dans les membranes cellulaires.



## 4 CONCLUSION

Dans ce troisième chapitre, des différences concomitantes de compositions lipidiques membranaires et de fonctions cellulaires, liées à la néoplasie disséminée, ont été mises en évidence dans les cellules circulantes de coques *Cerastoderma edule* et de myes *Mya arenaria*.

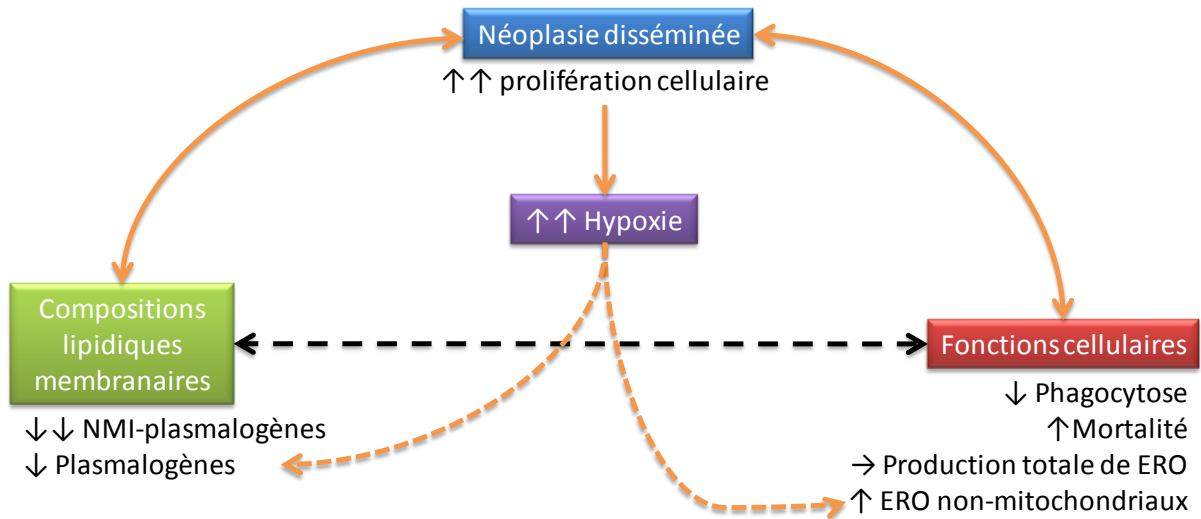
Parmi les variations fonctionnelles et/ou structurales inhérentes à la néoplasie disséminée qui ont été mises en évidence en comparant ces deux espèces, il est apparu que ce sont les espèces moléculaires les plus spécifiques qui voient leur proportion la plus diminuée par la néoplasie disséminée. Il s'agit, dans le cas de la coque, des NMI-PEplsm et -PSplsm, et dans une moindre mesure des 20:1n-11-PEplsm et -PSplsm et, dans celui de la mye, des 20:1n-11-PSplsm. De plus, cette perte de spécificité structurale des membranes des cellules néoplasiques, résultant de la faible proportion de ces espèces moléculaires, est observée en même temps qu'une perte de spécificité fonctionnelle commune aux deux espèces (diminution de la capacité de phagocytose notamment). Ces résultats vont dans le sens d'un possible rôle fonctionnel important de l'association spécifique des plasmalogènes avec ces acides gras particuliers chez les bivalves. Plus précisément, ces molécules pourraient être impliquées dans la phagocytose, processus clé des fonctions hématocytaires. Un autre point commun aux deux espèces étudiées est l'absence de différence concernant la production de ERO totale liée à la néoplasie disséminée. Bien que chez la coque, il a été suggéré, grâce à l'utilisation du CCCP, une localisation sub-cellulaire différente de la production de ERO dans les hématocytes et les cellules néoplasiques, cela reste à démontrer chez la mye. Toutefois, cela permet d'imaginer également un rôle des plasmalogènes en relation avec leur sensibilité aux ERO.

Cependant, des différences inter-spécifiques coque/mye, concernant les relations entre la néoplasie disséminée, la structure membranaire lipidique et les fonctions cellulaires,

existent également. En effet, uniquement chez la coque, une diminution plus globale de la proportion des plasmalogènes, toutes espèces moléculaires confondues, a pu être observée. Une hypothèse pour expliquer ces différences serait la différence de prolifération des cellules néoplasiques observée entre les deux espèces, beaucoup plus importante chez la coque. Contrairement aux observations réalisées dans le cas de la mye, directement liées à la néoplasie disséminée, il serait alors possible que celles réalisées dans le cas de la coque résultent également d'une hypoxie consécutive au développement de la pathologie (Figure 68). L'hypoxie pourrait en effet avoir des implications importantes tant au niveau fonctionnel (*e.g.* localisation subcellulaire des ERO) que membranaire (*e.g.* dégradation des plasmalogènes par les ERO).

Enfin, il a été récemment mis en évidence (Patra, 2008) que deux types de lipid-rafts existaient : des « Chol rafts » composés de cholestérol / sphingomyeline / cérebrosides et des « Cer rafts » composés de céramides / sphingomyeline / cérebrosides. Les « Cer rafts » seraient impliqués dans l'apoptose alors que les « Chol-rafts » seraient associés à l'homéostasie cellulaire. Cependant, lors de perturbations de la signalisation cellulaire, les « Chol rafts » auraient un rôle dans des mécanismes relatifs au cancer, telles la transformation cellulaire, la progression tumorale, l'angiogénèse et la formation de métastases. Ceci pourrait être une piste à approfondir pour expliquer les plus faibles proportions de stérols (deux fois plus faibles) dans les membranes des cellules néoplasiques de coques.

A - Effet de la néoplasie disséminée sur les cellules circulantes de l'hémolymphe chez la coque *Cerastoderma edule*



B - Effet de la néoplasie disséminée sur les cellules circulantes de l'hémolymphe chez la mye *Mya arenaria*

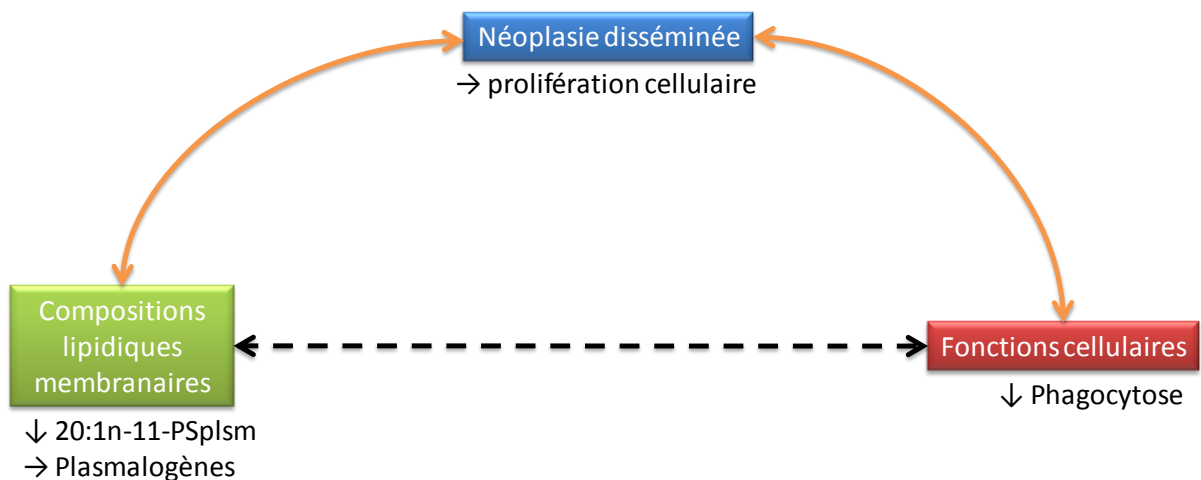


Figure 68: Schéma synthétique représentant les relations entre néoplasie disséminée, compositions lipidiques membranaires et fonctions cellulaires dans les cellules circulantes de deux espèces bivalves, la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria*. Les lignes en pointillés représentent des relations hypothétiques.





# CONCLUSION GENERALE



## CONCLUSION GENERALE

### 1 RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

Cette thèse avait pour but d'essayer d'apporter de nouveaux éléments pour la compréhension du rôle fonctionnel des lipides, notamment celui des différentes classes de phospholipides et de leur composition en acides gras. Pour cela, les modifications induites par une pathologie, la néoplasie disséminée, sur la composition lipidique membranaire et les fonctions cellulaires d'hémocytes de bivalves ont été étudiées.

### 2 ORIGINALITE DE L'ETUDE REALISEE

Une des particularités de la présente thèse réside dans le modèle biologique qui a été étudié puisqu'il ne s'agit pas d'un individu entier, ni même d'un organe, mais d'un type cellulaire. Le fait de travailler à cette échelle a permis d'analyser uniquement des caractéristiques structuro-fonctionnelles spécifiques à ce type cellulaire et d'augmenter ainsi la finesse des observations. Le choix des hémocytes de bivalves s'est avéré particulièrement pertinent puisque, comme montré dans le chapitre 1, ils présentent des compositions lipidiques membranaires très particulières, spécifiques à ce type cellulaire, notamment en ce qui concerne leur contenu élevé en plasmalogènes et en CAEP. Les hémocytes présentent également l'avantage d'avoir des fonctions spécifiques à leur type cellulaire, liées à leurs rôles dans l'immunité mais aussi dans la digestion ou la réparation des tissus.

## *Conclusion générale*

D'autre part, certaines des fonctions spécifiques aux hémocytes sont certainement intimement liées aux compositions lipidiques de leurs membranes cellulaires. Il s'agit par exemple de la phagocytose, dont il est facile de concevoir qu'elle pourrait être influencée par la composition lipidique membranaire puisque le processus de formation de pseudopodes, d'internalisation et de fusion membranaire nécessite une certaine plasticité de la membrane. A l'inverse, la production d'espèces réactives pourrait influencer la composition lipidique des membranes cellulaires, soit directement par un effet d'oxydation, soit indirectement par la mise en place par la cellule d'une membrane lipidique résistante à un potentiel stress oxydant. Ainsi, cette thèse a été plus loin qu'une simple étude descriptive et s'est inscrite dans un contexte d'études structuro-fonctionnelles des membranes cellulaires.

Enfin, de part son sujet, cette thèse a nécessité l'étude de paramètres relevant de différentes disciplines : de la chimie analytique pour la description fine des compositions lipidiques des membranes cellulaires, de la pathologie pour la mise en évidence de la néoplasie disséminée dans les coques du bassin d'Arcachon et de la biologie cellulaire pour l'étude du contenu en ADN et des changements fonctionnels des cellules circulantes de bivalves. Cette approche pluridisciplinaire a permis une meilleure compréhension des modifications structuro-fonctionnelles liées à la néoplasie disséminée.

### **3 PRINCIPALES DECOUVERTES ET PERSPECTIVES**

Dans les hémocytes des quatre espèces de bivalves étudiées, le CAEP s'est avéré compter parmi les trois classes de phospholipides les plus importantes des membranes cellulaires. Cela suggère un ou plusieurs rôles fonctionnels importants de ce sphingophosphonolipide dans les hémocytes. Dans la présente thèse, il a été suggéré que les CAEP pourraient être préférentiellement localisés dans les membranes de phagolysosomes, et jouer un rôle dans la résistance de ces membranes aux attaques enzymatiques et chimiques. D'autre part, le CAEP étant supposé, pour les formes animales primitives telles les mollusques bivalves, jouer un rôle identique à celui que joue la sphingomyéline dans les membranes cellulaires des formes plus évoluées (Vaskovsky, 1989), il pourrait aussi entrer dans la constitution des « lipid-rafts » ou radeaux lipidiques. Chez les mammifères, ces micro-domaines membranaires particulièrement rigides formés entre autres de sphingomyéline (Lindner and Naim, 2009), ont été montrés comme ayant des rôles fonctionnels essentiels, notamment dans la coordination de diverses voies de signalisation cellulaire (Laude and Prior, 2004).

Les proportions de certaines espèces moléculaires de phospholipides sont nettement modifiées dans les lipides membranaires des cellules néoplasiques, par rapport aux hémocytes. Il s'agit particulièrement de plus faibles proportions des espèces moléculaires de plasmalogènes associés aux NMI et/ou au 20:1n-11. Bien que leur rôle reste encore flou, le fait que les principales variations de la composition lipidique membranaire des hémocytes concernent spécifiquement les espèces moléculaires de plasmalogènes associés aux NMI et/ou au 20:1n-11 permet de confirmer l'hypothèse d'une importance fonctionnelle particulière de ces molécules (Kraffe et al., 2004). De telles variations de plasmalogènes associés à ces acides gras particuliers, biosynthétisés par les bivalves n'ont, à notre connaissance jamais été mises en évidence. L'explication de la faible proportion de ces

## Conclusion générale

espèces moléculaires dans les membranes néoplasiques reste à établir. Différentes hypothèses ont été émises.

Les acides gras NMI et le 20:1n-11 interviendraient, en association avec les plasmalogènes, dans des systèmes destinés à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène, en augmentant l'efficacité antioxydante des plasmalogènes et/ou en limitant la propagation de la péroxidation lipidique aux autres PL. Cependant, bien que quelques études aient montré que les plasmalogènes étaient particulièrement sensibles à l'oxydation, il s'agissait essentiellement d'études *in-vitro*. Le rôle antioxydant et/ou la sensibilité accrue à l'oxydation des plasmalogènes reste donc encore à être démontré *in-vivo*, que ce soit chez les mammifères ou chez les bivalves. Un stress oxydatif plus important dans les cellules néoplasiques pourrait donc expliquer ces proportions plus faibles de plasmalogènes, et plus particulièrement d'espèces moléculaires de plasmalogènes associés aux NMI et/ou au 20:1n-11. Ce stress oxydatif plus important résulterait, non pas d'une production de ERO plus importante, mais d'une localisation cellulaire différente et/ou d'une source différente des ERO. Pour confirmer l'hypothèse de la dégradation des plasmalogènes par les ERO, il serait intéressant d'analyser les produits de dégradation des plasmalogènes et de mesurer la peroxydation des lipides dans les deux types cellulaires étudiés.

Une autre hypothèse, pour expliquer la diminution des plasmalogènes serait que la synthèse de cette sous-classe de phospholipides soit plus faible par rapport aux deux autres sous-classes, les alkylacyls et les diacyls, dans les cellules néoplasiques. Compte tenu de la voie de synthèse des plasmalogènes, en partie commune à celle des alkylacyls, il est probable que dans l'hypothèse d'une diminution du taux de synthèse de plasmalogènes, celui des alkylacyls le soit également. L'étude de la proportion en alkylacyls et de leur composition spécifique en acides gras permettrait très certainement de mieux comprendre le mécanisme de diminution de la proportion des plasmalogènes dans les cellules néoplasiques de coques. A ce jour, il n'est pas possible de statuer sur ce point. En effet, les méthodes séparatives développées ici ont permis de dégager des informations essentielles

## Conclusion générale

au niveau des compositions en acides gras des formes plasmalogènes (PC, PE et PS) démontrant l'intérêt de l'analyse fine de la proportion et de la composition en acides gras de chaque classe et sous-classe de phospholipides. Toutefois, elle n'apparaît pas encore exhaustive puisque les formes alkylacyls et leur composition en acides gras n'ont pas pu être analysés séparément de celles des diacyls. Des mises au point analytiques ont cependant été entreprises au cours de cette thèse et devraient permettre d'obtenir très prochainement des informations biologiques sur ces formes alkyls, pour la coque et la mye.

Enfin, une grande partie de cette thèse a également été consacrée à aller plus loin dans la caractérisation de la néoplasie disséminée. Chronologiquement, cela a d'abord consisté à rechercher, et de fait, à mettre en évidence pour la première fois la présence de cette pathologie chez les coques du bassin d'Arcachon. Pratiquement, ceci nous a permis d'avoir accès, dans une certaine proximité géographique, à une population touchée par la néoplasie disséminée. L'étude fine de la ploïdie des cellules néoplasiques chez cette population de coques a permis de montrer l'existence de mécanismes complexes, multiples et évolutifs menant à des aneuploïdies variables. De tels mécanismes n'ont jamais été montrés auparavant chez les bivalves atteints de néoplasie disséminée. Il reste donc à statuer sur cette particularité, en analysant de la même manière l'aneuploïdie des cellules néoplasiques d'autres populations ou espèces de bivalves et d'essayer de mieux comprendre ces mécanismes, par exemple en effectuant des études caryologiques.

La prise en compte des caractéristiques précises de la néoplasie disséminée s'est révélée indispensable pour tenter de mieux comprendre l'origine des différences observées lors de l'étude comparative réalisée sur la mye *Mya arenaria* de l'île du Prince Edouard au niveau de la composition lipidique membranaire des cellules néoplasiques. L'hypothèse que, par rapport aux coques, les myes analysées présenteraient un stade inférieur de développement de la pathologie, a été émise. En effet, les cellules néoplasiques analysées dans le cas des coques étaient très concentrées, indiquant une prolifération cellulaire importante, mais l'étaient beaucoup moins dans celui des myes. L'existence d'un stade

### *Conclusion générale*

supplémentaire de développement de la maladie chez les myes, caractérisé par une prolifération des cellules néoplasiques mais non observé dans la présente étude, a alors été suggérée. Bien que cela reste purement hypothétique, statuer sur ce fait serait facilement réalisable en étudiant de façon routinière la concentration cellulaire dans l'hémolymph de myes malades. D'autre part, les cellules néoplasiques de coques étant beaucoup plus concentrées que celles de myes, il est possible de suggérer un environnement plus hypoxique pour les premières que pour les secondes (Sunila, 1991). Cela pourrait alors expliquer certaines différences entre les deux espèces étudiées quant à l'effet de la néoplasie disséminée sur la composition lipidique membranaire de leurs cellules circulantes. En effet, il est possible que dans le cas des coques, des modifications observées soient non seulement liées à la néoplasie disséminée mais aussi à l'hypoxie, alors que dans le cas des myes, elle ne seraient liées qu'à l'effet de la néoplasie disséminée. Une méthode pour vérifier cette hypothèse pourrait être de tester l'effet de l'hypoxie sur la composition lipidique membranaire d'hémocytes de bivalves.







# LISTE DES TABLES

Table 1: Composition relative des phospholipides de mollusques. Extrait de Vaskovsky (1989).	51
Table 2: Composition relative en phospholipides des organes de mollusques Extrait de Vaskovsky (1989).	51
Table 3: Proportions de plasmalogènes dans les lipides polaires des mollusques marins (en % de la classe ou des phospholipides totaux). Extrait de Vaskovsky (1989).	53
Table 4: Récapitulatif des différentes méthodes de diagnostic par microscopie optique, des critères utilisés et des diagnostics correspondants.	84
Table 5 : Phospholipid (PL) quantities and composition in hemocytes from <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> .	138
Table 6: Fatty acid (FA) composition of CL, PI, CAEP and LysoPC in hemocytes from <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> .	141
Table 7: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS in hemocytes from <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> .	143
Table 8: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS in hemocytes from <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> .	145
Table 9: Phospholipid (PL) quantities and composition in hemocytes from <i>C. edule</i> and <i>Mya arenaria</i> .	157
Table 10: Fatty acid (FA) composition of CL, PI, CAEP and LysoPC in hemocytes from <i>C. edule</i> and <i>Mya arenaria</i> .	159
Table 11: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS in hemocytes from <i>C. edule</i> and <i>Mya arenaria</i> .	162
Table 12: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS in hemocytes from <i>C. edule</i> and <i>Mya arenaria</i> .	165
Table 13: Distribution of NMI FA and 20:1n-11 in PL classes and subclasses of <i>Mya arenaria</i> , <i>Cerastoderma edule</i> , <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> . Only the percentage of NMI FA and 20:1n-11 that is associated to PEplsm, PSplsm and total plasmalogen is indicated.	172



# LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schémas de granulocytes (A) et de hyalinocytes (B). D'après Soudant et al. (2008).	25
Figure 2: Photographie en microscopie optique d'un frottis d'hémolymph de coque <i>Cerastoderma edule</i> réalisé par cytocentrifugation. Coloration Hemacolor Kit. Grossissement x 40 (x 100 pour l'encart). AHY : hyalinocytes acidophiles ; BHY : hyalinocytes basophiles ; AGR : granulocytes acidophiles.	25
Figure 3: Représentation schématique des processus de phagocytose et d'encapsulation. D'après Soudant et al. (2008).	27
Figure 4: Processus hypothétique du rôle des lectines dans la reconnaissance et l'élimination des parasites par les hémocytes de palourdes. D'après Soudant et al. (2008).	28
Figure 5: Présentation hypothétique des mécanismes impliqués dans la production des principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, au niveau extracellulaire (gauche) ou dans le phagosome (droite). *NO: oxyde nitrique; ONOO-: peroxyxynitrite; O2-: anion superoxyde; HOCl: hypochloride; iNOS: oxyde nitrique synthase inductible; SOD: superoxyde dismutase; EC-SOD: superoxyde dismutase extracellulaire; MPO: myeloperoxydase. D'après Soudant et al. (2008).	30
Figure 6: Schémas représentant un hémocyte (A) et une cellule néoplasique (B) de coque <i>C. edule</i> , à la même échelle.	32
Figure 7: Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires.	42
Figure 8: Différents modes d'arrangement spontané de molécules lipidiques amphiphiles en environnement aqueux : liposome, micelle et bicouche ou feuillet.	43
Figure 9: Eléments structuraux d'une membrane cellulaire	43
Figure 10: Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ». 45	45
Figure 11: Structure des acides gras NMI chez les mollusques bivalves. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de chacune des doubles liaisons, comptée à partir de la fonction acide.	45
Figure 12: Structure des acides gras branchés de forme « iso » et « anteiso ».	46
Figure 13: Structure des principaux phospholipides	47
Figure 14: Structure des différentes sous-classes de la phosphatidyléthanolamine	49
Figure 15: Biosynthèse de l'acide palmitique 16:0	55
Figure 16: Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Les chiffres entre [] indiquent la position de chacune des doubles liaisons comptée à partir de la fonction acide.	57
Figure 17: Biosynthèse des AG NMI et du 20:1n-11 (Kraffe, 2003)	58

Figure 18: Biosynthèse des phospholipides	61
Figure 19: Biosynthèse de la PE plasmalogène	63
Figure 20: Représentation schématique des phases lamellaire et hexagonale inverse	66
Figure 21: Vue d'ensemble des principales analyses et études réalisées lors de la présente thèse : modèles biologiques, lieu et date d'échantillonnage, et analyses réalisées.	75
Figure 22: Site d'étude de la néoplasie disséminée : le Banc d'Arguin est situé à l'entrée du bassin d'Arcachon.	76
Figure 23: A : prélèvement d'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur d'une coque <i>Cerastoderma edule</i> . B : localisation de ce muscle.	79
Figure 24: Echantillons bruts d'hémolymphe. A : hémolymphe d'une coque « saine ». B : hémolymphe d'une coque « malade ». Sans coloration. Grossissement x 20.	79
Figure 25: Frottis d'hémolymphe réalisés par la méthode de cytocentrifugation. A : hémolymphe d'une coque « saine ». B : hémolymphe d'une coque « malade ». Coloration éosine/hématoxyline. Grossissement x 100.	81
Figure 26: Frottis d'hémolymphe réalisés par la méthode des lames Poly L-lysine. A : hémolymphe d'une coque « saine ». B : hémolymphe d'une coque « malade ». Coloration éosine/hématoxyline. Grossissement x 100.	82
Figure 27: Diffraction de la lumière émise par le laser d'un cytomètre en flux lorsqu'elle rencontre une cellule. La diffraction aux petits angles (Forward Scatter = FSC) reflète la taille de la cellule alors que celle aux grands angles (Side Scatter = SSC) reflète sa complexité.	85
Figure 28: Méthode de discrimination des doublets basée sur l'analyse de la hauteur, de la largeur et de l'aire des signaux de fluorescence FL2 relatifs au contenu en ADN. A : Valeurs de l'aire et de la hauteur du pulse en fonction du type de cellule analysé (cellule normale isolée, doublet de cellules normales ou cellule isolée en mitose. B : Paramètres caractérisant le signal créé par l'analyse d'une cellule par cytométrie en flux (aire, hauteur et largeur).	89
Figure 29 : A : « Density plot » représentant la largeur (FL2 width) et la surface (FL2 Area) des pulses produits par les hémocytes d'une coque saine marqués à l'iodure de propidium. Les cellules isolées sont regroupées dans la région 1 (R1). B : Histogramme de l'aire des pulses, proportionnelle à la ploïdie des cellules, correspondant aux cellules isolées sélectionnées à partir de la région R1 de la figure A. La majorité des cellules présentent un contenu en ADN diploïde (phase G0/G1). Une petite fraction des cellules présentent un contenu en ADN deux fois plus grand et sont tétraploïdes (phase G2/M).	91
Figure 30 : A : « Density plot » représentant la largeur (FL2 width) et la surface (FL2 Area) des pulses produits par les hémocytes d'une coque néoplasique marqués à l'iodure de propidium. Les cellules isolées sont regroupées dans la région 1 (R1). B : Histogramme de l'aire des pulses, proportionnelle à la ploïdie des cellules, correspondant aux cellules isolées sélectionnées à partir de la région R1 de la figure A. Une	

petite fraction des cellules présente un contenu en ADN diploïdes (phase G0/G1). La majorité des cellules présentent un contenu en ADN 2.5 fois plus grand et sont pentaploïdes.	91
Figure 31: Site de prélèvement des myes (North River, île du Prince Edouard, Canada)	94
Figure 32: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) de coque, en mars 2009, pour l'étude de la néoplasie et l'analyse des paramètres hématocytaires.	97
Figure 33: Cytogramme « density plot » représentant les hématocytes de coque en fonction de leurs fluorescences verte et rouge, après marquage au SYBR Green et à l'IP. Les hématocytes morts, marqués à la fois par le SYBR Green et l'IP présentent des intensités de fluorescence verte et rouge élevées, alors que les hématocytes vivants, marqués uniquement par le SYBR Green présentent une intensité de fluorescence verte élevée mais une intensité de fluorescence rouge faible.	99
Figure 34: Cytogramme « density plot » représentant les hématocytes de coque en fonction de leurs fluorescence verte et de leur « complexité » (SSC), après marquage au SYBR Green et fixation dans du formol 6%.	100
Figure 35: Histogramme représentant le nombre d'hématocytes de coques en fonction de leur fluorescence verte, associée à l'ingestion des billes de latex. L'activité phagocytaire est déterminée comme le pourcentage d'hématocytes ayant phagocyté plus de 3 billes.	101
Figure 36: Cytogramme « density plot » représentant les hématocytes de coques en fonction de leur « complexité » et de leur fluorescence verte due à l'ajout de DCFH-DA et proportionnelle à la quantité d'ERO intracellulaires. La quantité d'ERO est calculée comme la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence verte (unités arbitraires).	103
Figure 37: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) de mye, en mai 2008, pour l'étude de la néoplasie, les analyses lipidiques et l'analyse des paramètres hématocytaires.	105
Figure 38: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) de coque, durant le suivi saisonnier 2007-2008, pour l'étude de la néoplasie et les analyses lipidiques.	109
Figure 39: Schéma du protocole de manipulation suivi lors des prélèvements d'hémolymph (HL) d'huître et de palourde, en janvier 2007 et décembre 2006 pour les analyses lipidiques.	111
Figure 40: Characteristics of <i>Crassostrea gigas</i> (A, C, E) and <i>Ruditapes philippinarum</i> (B, D, F) hemocytes. A, B: Density plots obtained by flow cytometry, representing forward scatter (FCS, size) and side scatter (SSC, internal complexity) values of hemocytes of both species, and allowing distinguishing different cell sub-populations. C, D; E, F: Light-microscopy photos of hemocytes from hemolymph cell monolayers prepared by cyto-centrifugation (C and D) and by spontaneous cell adhesion (E and F). Coloration RAL 555 kit. Magnification x 100.	147
Figure 41: Relative proportion (in mol%) of 22:2NMI(7,13) and 22:3NMI(7,13,16) in fonction of 22:2NMI(7,15) in PEplsm and PSplsm from <i>C. edule</i> , <i>R. philippinarum</i> and <i>C. gigas</i> .	171
Figure 42: Rappel des voies de biosynthèse supposées des NMI et du 20:1n-11	171

- Figure 43:** Principales caractéristiques de la composition lipidique membranaire d'hémocytes de *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum*, *Cerastoderma edule* et *Mya arenaria*. Les données sont des moyennes exprimées en mol% (n=5 pour *C. gigas* et *R. philippinarum*, n=3 pour *C. edule* et *M. arenaria*). A : Proportion de CAEP. B : Proportion d'acides gras branchés dans le CAEP. C : Proportion de plasmalogènes. D : Proportions d'acides gras NMI et de 20:1n-11 dans les plasmalogènes. E : Proportions relatives des acides gras C22NMI dans les plasmalogènes. 175
- Figure 44 :** Distribution des myes en fonction du stade de développement de la néoplasie disséminée : saines (stade 0), légèrement malades (stade 1), modérément malades (stade 2) ou très malades (stade 3). Pour certains individus, aucun diagnostic précis n'a pu être établi (stade indéterminé, noté Ind.). 192
- Figure 45:** Concentrations cellulaires ( $10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) dans des pools d'hémolymphe de mye *Mya arenaria* en fonction du stade de développement de la néoplasie disséminée : pools d'individus sains (stade 0) et pools d'individus très malades (stade 3). 193
- Figure 46:** Exemples de cytogrammes obtenus par cytométrie en flux de cellules d'hémolymphe de myes *Mya arenaria* atteintes de néoplasie disséminée. Les pics représentent la distribution des cellules en fonction de leur contenu en ADN. Deux pics sont détectables : celui correspondant à une ploïdie de 2n, représentant les hémocytes normaux, et celui correspondant à une ploïdie de 4n, représentant les cellules néoplasiques. Différents stades de développement de la pathologie sont représentés. Ils se différencient par la proportion de cellules 4n dans l'hémolymphe : stade 1 (de 20% à 50%), stade 2 (de 50% à 75%) et stade 3 (plus de 75%). Pour chaque exemple, les nuages de points correspondent à la distribution en termes de « forward scatter » (FSC, taille relative) et de « side scatter » (SSC, complexité relative) des hémocytes 2n (en vert) et des cellules néoplasiques 4n (en bleu). 195
- Figure 47:** Distribution de la ploïdie des cellules aneuploïdes de myes néoplasiques en fonction de leur stade de développement de la maladie (stade 1 ou stade 2-3). Les données sont exprimées en pourcentage des individus néoplasiques (n = 60). 196
- Figure 48:** Schémas hypothétiques de l'évolution de la concentration des cellules de l'hémolymphe (en rouge) et de la proportion de cellules néoplasiques dans l'hémolymphe (en bleu) en fonction du temps chez (A) la mye *Mya arenaria* de l'île du prince Edouard et chez (B) la coque *Cerastoderma edule* du bassin d'Arcachon (B), atteintes de néoplasie disséminée. 198
- Figure 49:** Schéma hypothétique représentant les différentes interactions possibles entre les éléments pouvant influencer sur l'induction et le développement de la néoplasie disséminée. 199
- Figure 50:** A: Total phospholipid (PL), PL class and subclass (diacyl+alkyl, plasmalogen and CAEP are detailed in insert) and sterol quantities, expressed in nmol.10<sup>-6</sup> cells. B: Percentage of stero among membrane lipids (PL + sterols), expressed in mol%. C: Neutral lipid quantities, expressed in ng.10<sup>-6</sup> cells. Data are mean ± standard error (n=3). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 225



Figure 51: Composition in neutral lipid classes. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in g% of total neutral lipids. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 225

Figure 52: A: Composition in phospholipid (PL) classes and subclasses. B: Ratio of the plasmalogen form to the diacyl + alkyl + plasmalogen forms of a PL class Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3), in mol% of total PL (A) or of total class (B). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 227

Figure 53: Fatty acid (FA) composition of total neutral lipids, polar lipids and PI. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 230

Figure 54: Fatty acid (FA) composition of Lyso PC, CL and CAEP. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 231

Figure 55: Fatty acid (FA) composition of diacyl+alkyl fractions of PC, PE and PS. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 233

Figure 56: Fatty acid (FA) composition of plasmalogen fractions of PC, PE and PS. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3) in mol% of the total FA of the class. Branched FA are mainly anteiso 17:0 and iso 17:0. 20:xNMI are mainly 20:2NMI(5,11) and 20:2NMI(5,13). Others are 20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6 and 21:5n-3, each accounting for less than 1.0% of the total FA. The total percentage of *sn*-2 FA was adjusted to 50% to take into account the alkenyl chains of the *sn*-1 position hydrolyzed by the acid mobile phase as described in the Material and Methods section. Stars indicate significant different values between

*Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 236

Figure 57: A: proportion of 20:1n-11 and NMI FA, expressed in mol% of the total polar FA. B: Proportion of 20:1n-11 and NMI FA linked to plasmalogen, expressed in mol% of total 20:1n-11 and NMI FA. C: Proportion of 20:1n-11-plasmalogen and NMI FA-plasmalogen molecular species, expressed in mol% of total PL. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n=3). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 237

Figure 58: A: Total hemocytes count (THC) expressed in  $10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>. B: Percentage of mortality (%). C: Phagocytosis activity (%). D: Reactive oxygene species (ROS) production, expressed in arbitrary units (U.A.). E: CCCP-induced ROS production inhibition (%). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error (n = 19 for hemocytes, n = 6 for neoplastic cells). Stars indicate significant different values between *Cerastoderma edule* hemocytes and neoplastic cells, at the probability thresholds  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) or  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 239

Figure 59: A : Quantités de phospholipides (PL) et de stérols, exprimées en pmol.10<sup>-6</sup> cellules. B : Quantités de lipides neutres, exprimées en ng.10<sup>-6</sup> cellules. Moyenne  $\pm$  erreur standard (n=3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 253

Figure 60: A : Composition en classes et sous-classes de phospholipides (PL). B : Pourcentage de plasmalogènes parmi les PL totaux et parmi PC, PE et PS. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des PL totaux (A, B)) ou d'une classe de PL (B). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 255

Figure 61: Composition en classes de lipides neutres. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3), exprimées en g% des lipides neutres totaux. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 256

Figure 62: Composition en acides gras du CL et de la PI. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20 :xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 258

Figure 63: Composition en acides gras du CAEP et de la LysoPC. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés

(principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20 :xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 259

Figure 64: Composition en acides gras des fractions diacyl+alkyl de la PC, de la PE et de la PS. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20 :xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 261

Figure 65: Composition en acides gras des fractions plasmalogènes de la PC, de la PE et de la PS. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  erreur standard (n=3) exprimées en mol% des acides gras totaux. Branched: acides gras branchés (principalement anteiso 17:0 and iso 17:0). 20 :xNMI : principalement 20:2NMI(5,11) et 20:2NMI(5,13). Others: Total de 13 acides gras détectables présentant une proportion <1.0% (20:0, 22:0, 16:1n-5, 18:1n-5, 18:3n-3, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-3, 21:4n-6, 21:5n-3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). Le pourcentage total d'acides gras sn-2 a été ajustée à 50% afin de prendre en compte la chaîne alkényle sn-1 hydrolysée par la phase acide mobile lors de la séparation des sous-classes. 263

Figure 66: A : Proportions d'acides gras 20:1n-11 dans les acides gras polaires totaux. B : Proportions des espèces moléculaires plasmalogènes/20:1n-11 (plsm 20:1n-11), par rapport aux phospholipides totaux (/PL tot) et aux plasmalogènes totaux (/plsm tot). Moyenne  $\pm$  erreur standard (n=3). Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes et les cellules néoplasiques de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 264

Figure 67: A : Capacité de phagocytose (%). D : Production de ERO (U.A). Moyenne  $\pm$  erreur standard. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les hémocytes (n=32) et les cellules néoplasiques (n=15) de *Mya arenaria*, aux seuils de probabilité  $\alpha = 0.1$  (\*),  $\alpha = 0.05$  (\*\*) ou  $\alpha = 0.01$  (\*\*\*). 265

Figure 68: Schéma synthétique représentant les relations entre néoplasie disséminée, compositions lipidiques membranaires et fonctions cellulaires dans les cellules circulantes de deux espèces bivalves, la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria*. Les lignes en pointillés représentent des relations hypothétiques. 273



# BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

- AboElkhair, M., Siah, A., Clark, K.F., McKenna, P., Pariseau, J., Greenwood, S.J., Berthe, F.C.J., Cepica, A., 2009. Reverse transcriptase activity associated with haemic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Dis. Aquat. Org.* 84, 57-63.
- Ackman, R.G., Hooper, S.N., 1973. Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two molluscs (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 46, 153-165.
- Aley, S.B., Scott, W.A., Cohn, Z.A., 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152, 391-404.
- Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33, 123-128.
- Andrä, J., Berninghausen, O., Leippe, M., 2004. Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett.* 564, 109-115.
- Arnold, R.S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A.M., Sun, C.Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., Petros, J.A., Lambeth, J.D., 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5550-5555.
- Arthur, G., Page, L., 1991. Synthesis of phosphatidylethanolamine and ethanolamine plasmalogen by the CDP-ethanolamine and decarboxylase pathways in rat heart, kidney and liver. *Biochem. J.* 273, 121-125.
- Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. In: Fisher, W.S. (Ed.), *Disease processes in marine bivalve molluscs*. *Am. Fish. Soc. Special Publication*, 18, pp. 169-177.
- Auffret, M., Poder, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II: Electron microscopical study. *Aquaculture* 58, 9-15.
- Auffret, M., Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalve mollusc hemocytes. In: Stolen, J.S., Fletcher, C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Soderhall, K., Weeks-Perkins, B.A. (Eds.), *Techniques in fish immunology*. SOS Publication, Fair Heaven, pp. 55-63.

- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. A 118, 705-712.
- Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. Blood 93, 1464-1476.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol. 12, 549-559.
- Bachère, E., Mialhe, E., No I, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture 132, 17-32.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol. Rev. 198, 149-168.
- Balouet, G., Poder, M., 1980. A proposal for classification of normal and neoplastic types of blood cells in molluscs. Adv. Comp. Leuk. Res., 205-208.
- Balouet, G., Poder, M., Cahour, A., Auffret, M., 1986. Proliferative hemocytic condition in European flat oysters (*Ostrea edulis*) from Breton coasts: a 6-year survey. J. Invertebr. Pathol. 48, 208-215.
- Barber, B.J., 1990a. Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft shell clams, *Mya arenaria*, from the Shrewsbury River, New Jersey. In: Perkins F.O., Cheng T.C. (Eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 377-386.
- Barber, B.J., 1990b. Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft shell clams, *Mya arenaria*, from the Shrewsbury River, New Jersey. In: Perkins F.O., Cheng T.C. (Eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 377-386.
- Barber, B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. Aquat. Living. Resour. 17, 449-466.
- Barnathan, G., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. Biochimie 91, 671-678.
- Beckmann, N., Morse, P.P., Moore, C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. J. Invertebr. Pathol. 59, 124-132.



- Brites, P., Waterham, H.R., Wanders, R.J.A., 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1636, 219-231.
- Brookes, P.S., 2005. Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biol. Med.* 38, 12-23.
- Brousseau, D.J., 1987. Seasonal aspects of sarcomatous neoplasia in *Mya arenaria* (soft-shell clam) from Long Island Sound. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 269-276.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A., 1991. Disease progression and mortality in neoplastic *Mya arenaria* in the field. *Mar. Biol.* 110, 249-252.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A., 1994. Notes on epizootiological aspects (sex and age) of disseminated neoplasia in *Mya arenaria* from Long Island Sound. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 214-216.
- Brown, J.M., Attardi, L.D., 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 231-237.
- Brown, R.S., 1980. The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three-year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer* 179, 125-128.
- Brown, R.S., Wolke, R.E., Saila, S.B., Brown, C.W., 1977. Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 298, 522-534.
- Brusselmans, K., Swinnen, J.V., 2008. The Lipogenic Switch in Cancer. In: Singh, K.K., Costelle, L.C. (Eds.), *Mitochondria and Cancer*. Springer, New York, New York, pp. 39-59.
- Calder, P.C., 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr. Res.* 21, 309-341.
- Calder, P.C., 2008. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79, 101-108.
- Carballal, M.J., Carmen Lopez, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 29, 127-135.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 78, 87-97.
- Chapelle, S., 1987. Plasmalogens and O-alkylglycerophospholipids in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 88, 507-510.

## Bibliographie

- Chelomin, V.P., Zhukova, N.N., 1981. Lipid composition and some aspects of aminophospholipid organization in erythrocyte membrane of the marine bivalve mollusc *Scapharca broughtoni* (Schrenck). *Comp. Biochem. Physiol. B* 69, 599–604.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, London, UK, pp. 231-300.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, pp. 299–333.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, N., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology*. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp. 1–42.
- Collins, C., 1998. Studies on a Neoplasm of the Cockle, *Cerastoderma edule* (Linnaeus). Ph. D. thesis dissertation, National University of Ireland, Cork, pp. 155.
- Collins, C.M., Mulcahy, M.F., 2003. Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.* 54, 61-67.
- Conte, A., Ottaviani, E., 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Lett.* 365, 120-124.
- Cooper, K.R., Brown, R.S., Chang, P.W., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 149-157.
- da Silva, P.M., Villalba, A., 2004. Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 97-104.
- da Silva, P.M., Soudant, P., Carballal, M.J., Lambert, C., Villalba, A., 2005. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.* 67, 133-139.
- Daum, G., 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* 822, 1-42.
- de Koning, A.J., 1966. Phospholipids of marine origin. IV. The abalone (*Haliotis midae*). *J. Sci. Food Agr.* 17, 460.
- de Kruijff, B., 1997a. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 564-569.
- de Kruijff, B., 1997b. Lipids beyond the bilayer. *Nature* 386, 129-130.

## Bibliographie

- de Montaudouin, X., Paul-Pont, I., Lambert, C., Gonzalez, P., Raymond, N., Jude, F., Legeay, A., Baudrimont, M., Dang, C., Le Grand, F., 2010. Bivalve population health: Multistress to identify hot spots. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1307-1318.
- De Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., Brenner, R.R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids* 11, 561-566.
- De Moreno, R.J., 1980. Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus Platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 48, 263-276.
- de Pablo, M.A., de Cienfuegos, G., 2000. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol.* 78, 31-39.
- de Pablo, M.A., Puertollano, M.A., de Cienfuegos, G., 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clin. Vaccine Immunol.* 9, 945-950.
- Delaporte, M., 2005. Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Ph. D. thesis dissertation, Université de Rennes 1, pp. 362.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., Samain, J.F., 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567-576.
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed *T-Iso* supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 261-275.
- Delaporte, M., Synard, S., Pariseau, J., McKenna, P., Tremblay, R., Davidson, J., Berthe, F.C.J., 2008. Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 190-197.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053-3064.
- Dembitsky, V.M., 1979. Plasmalogens in phospholipids of marine invertebrates. *Biol. Morya* 5, 86-90.
- Dembitsky, V.M., Vaskovsky, V.E., 1976. Distribution of plasmalogens in different classes of phospholipids of marine invertebrates. *Biol. Morya* 5, 68-72.

- Desclaux, C., de Montaudouin, X., Bachelet, G., 2002. Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Dis. Aquat. Org.* 52, 137-149.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10-24.
- Duhm, J., Engelmann, B., Schönthier, U.M., Streich, S., 1993. Accelerated maximal velocity of the red blood cell Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in hyperlipidemia is related to increase in 1-palmitoyl, 2-arachidonoyl-plasmalogen phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* 1149, 185-188.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., 1993. The effect of lyophilization on the solvent extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 28, 937-944.
- Elston, R.A., Kent, M.L., Drum, A.S., 1988. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Org.* 4, 135-142.
- Elston, R.A., Drum, A.S., Allen, S.K., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Org.* 8, 51-59.
- Elston, R.A., Moore, J.D., Brooks, K., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Rev. Aquat. Sci.* 6, 449-466.
- Engelmann, B., Schönthier, U.M., Richter, W.O., Duhm, J., 1992. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. II. Increases in distinct molecular species of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine containing arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 1165, 38-44.
- Evan, G.I., Vousden, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Fallani, A., Mannori, G., Ruggieri, S., 2006. Composition of ether-linked sub-classes of glycerophospholipids in clones with a different metastatic potential isolated from a murine fibrosarcoma line (T3 cells). *Int. J. Cancer* 62, 230-232.
- Farley, C.A., 1969a. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31, 541-555.
- Farley, C.A., 1969b. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 509-516.
- Farley, C.A., 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. *Prog. Exp. Tumor. Res.* 20, 283-294.

- Farley, C.A., Otto, S.V., Reinisch, C.L., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, *Mya arenaria*. Fish. Bull. 84, 851-857.
- Farley, C.A., Plutschak, D.L., Scott, R.F., 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma in Maryland softshell clams, *Mya arenaria*, 1984-1988. Environ. Health Perspec. 90, 35-41.
- Fisher, W.S., 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: Fisher, W.S. (Ed.), Disease processes in marine bivalve molluscs. Am. Fish. Soc. Special Publication, pp. 225-237.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- Ford, S.E., Barber, R.D., Marks, E., 1997. Disseminated neoplasia in juvenile eastern oysters *Crassostrea virginica*, and its relationship to the reproductive cycle. Dis. Aquat. Org. 28, 73-77.
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science 294, 1871-1875.
- Fyfe, P.K., McAuley, K.E., Roszak, A.W., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J., Jones, M.R., 2001. Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. Trends Biochem. Sci. 26, 106-112.
- Garrido, J.L., Medina, I., 2002. Identification of minor fatty acids in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by GC-MS of their 2-alkenyl-4, 4-dimethyloxazoline derivatives. Anal. Chim. Acta 465, 409-416.
- Giorgione, J., Epand, R.M., Buda, C., Farkas, T., 1995. Role of phospholipids containing docosahexaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9767-9770.
- Glaser, P.E., Gross, R.W., 1994. Plasmamembrane facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion. Biochemistry 33, 5805-5812.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P., 2009. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 97, 96-108.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radical Res. 31, 261-272.

- Halliwell, B., 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 401, 1-12.
- Hanuš, L.O., Levitsky, D.O., Shkrob, I., Dembitsky, V.M., 2009. Plasmalogens, fatty acids and alkyl glyceryl ethers of marine and freshwater clams and mussels. *Food Chem.* 116, 491-498.
- Harbige, L.S., 2003. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: A question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38, 323-341.
- Hatch, G.M., Choy, P.C., 2004. Phospholipid biosynthesis. In: Van der Vusse, G. (Ed.), *Advances in molecular and cell biology, Lipobiology*. Elsevier, pp. 357-385.
- Hawthorne, J.N., Ansell, G.B., 1982. *Phospholipids*. Elsevier.
- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 367-385.
- Holub, B.J., Kuksis, A., Thompson, W., 1970. Molecular species of mono-, di-, and triphosphoinositides of bovine brain. *J. Lipid Res.* 11, 558-564.
- Horrobin, D.F., Jenkins, K., Bennett, C.N., Christie, W.W., 2002. Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid: collaboration and not antagonism is the key to biological understanding. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 83-90.
- House, M.L., Kim, C.H., Reno, P.W., 1998. Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis. Aquat. Org.* 34, 187-192.
- Howard, B.V., Morris, H.P., Bailey, J.M., 1972. Ether-lipids,  $\alpha$ -glycerol phosphate dehydrogenase, and growth rate in tumors and cultured cells. *Cancer Res.* 32, 1533-1538.
- Howard, D.W., Smith, C.S., 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks NOAA Tech. Memo. US Department of Commerce NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, M.A., pp. 97.
- Hulbert, A.J., Else, P.L., 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199, 257-274.
- Irazu, C.E., Pollero, R.J., Brenner, R.R., 1984. Occurrence of a 22:2 nonmethylene interrupted dienoic fatty acid and its seasonal distribution among lipids and tissues of the fresh water bivalve *Diplodon delodontus* from an isolated environment. *Lipids* 19, 649-655.
- James, P.F., Lake, A.C., Hajra, A.K., Larkins, L.K., Robinson, M., Buchanan, F.G., Zoeller, R.A., 1997. An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 23540-23546.

- Jeong, B.Y., Ohshima, T., Koizumi, C., 1990. Molecular species of 1-*O*-alk-1'-enyl-2-acyl-, 1-*O*-alk-2-acyl- and 1, 2-diacylglycerophospholipids in Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Lipids* 25, 624-632.
- Joseph, J.D., 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid Res.* 21, 109-153.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Tokiwa, S., Kayama, M., Hirata, M., 1979. Essential fatty acids in the diet of prawn - II. Effect of docosahexaenoic acid on growth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 45, 1151-1153.
- Kaneda, T., 1991. Iso-and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 55, 288-302.
- Katz-Brull, R., Seger, D., Rivenson-Segal, D., Rushkin, E., Degani, H., 2002. Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. *Cancer Res.* 62, 1966-1970.
- Kawashima, H., Ohnishi, M., 2004. Identification of minor fatty acids and various nonmethylene-interrupted diene isomers in mantle, muscle, and viscera of the marine bivalve *Megangulus zyonoensis*. *Lipids* 39, 265-271.
- Kent, M.L., Elston, R.A., Wilkinson, M.T., Drum, A.S., 1989. Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hemic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 53, 378-386.
- Kim, J., Dang, C.V., 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 66, 8927-8930.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177-185.
- Klingensmith, J.S., 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17, 976-981.
- Knapp, H.R., Hullin, F., Salem Jr, N., 1994. Asymmetric incorporation of dietary n-3 fatty acids into membrane aminophospholipids of human erythrocytes. *J. Lipid Res.* 35, 1283-1291.
- Koizumi, C., Jeong, B.Y., Ohshima, T., 1990. Fatty chain composition of ether and ester glycerophospholipids in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Lipids* 25, 363-370.
- Kostetsky, E.Y., Velansky, P.V., 2009. Phospholipids of sea worms, mollusks, and arthropods. *Russ. J. Mar. Biol.* 35, 187-199.

## Bibliographie

- Kraffe, E., 2003. Etude de la spécificité du cardiolipide et des plasmalogènes chez les mollusques bivalves; apport des méthodes chromatographiques. Ph. D. thesis dissertation, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 243.
- Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids* 39, 59-66.
- Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., 2006. cis-4, 7, 10, trans-13–22 4 fatty acid distribution in phospholipids of pectinid species *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus*. *Lipids* 41, 491-497.
- Kraffe, E., Marty, Y., Guderley, H., 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J. Exp. Biol.* 210, 149-165.
- Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., Kervarec, N., 2005. Docosahexaenoic acid-and eicosapentaenoic acid-enriched cardiolipin in the manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Lipids* 40, 619-625.
- Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., Kervarec, N., Jehan, P., 2002. Evidence of a tetradocosahexaenoic cardiolipin in some marine bivalves. *Lipids* 37, 507-514.
- Kraffe, E., Grall, J., Le Duff, M., Soudant, P., Marty, Y., 2008a. A striking parallel between cardiolipin fatty acid composition and phylogenetic belonging in marine bivalves: A possible adaptative evolution? *Lipids* 43, 961-970.
- Kraffe, E., Tremblay, R., Belvin, S., LeCoz, J.R., Marty, Y., Guderley, H., 2008b. Effect of reproduction on escape responses, metabolic rates and muscle mitochondrial properties in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Mar. Biol.* 156, 25-38.
- Krishan, A., 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell. Biol.* 66, 188-193.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Snider, R.G., Kagley, A.N., Varanasi, U., 1999. Environmental contaminants and the prevalence of hemic neoplasia (leukemia) in the common mussel (*Mytilus edulis* Complex) from Puget Sound, Washington, USA. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 135-146.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J., 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.
- Kuczynski, B., Reo, N.V., 2006. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem. Res.* 31, 639-656.
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R.B., Koul, H.K., 2008. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* 68, 1777-1785.



- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225-240.
- Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.F., 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.
- Laude, A.J., Prior, I.A., 2004. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol. Membr. Biol.* 21, 193-205.
- Le Grand, F., Kraffe, E., de Montaudouin, X., Villalba, A., Marty, Y., Soudant, P., 2010. Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment. *J. Invertebr. Pathol.* 104, 110-118.
- Lee, T., 1998. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 1394, 129-145.
- Lee, T., Qian, C., Snyder, F., 1991. Biosynthesis of choline plasmalogens in neonatal rat myocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 286, 498-503.
- Lennartz, M.R., 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 415-430.
- Leray, C., Cazenave, J.P., Gachet, C., 2002. Platelet phospholipids are differentially protected against oxidative degradation by plasmalogens. *Lipids* 37, 285-290.
- Leßig, J., Fuchs, B., 2009. Plasmalogens in biological systems: Their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr. Med. Chem.* 16, 2021-2041.
- Lin, D.A., Boyce, J.A., 2006. Lysophospholipids as mediators of immunity. *Adv. Immunol.* 89, 141-168.
- Lindner, R., Naim, H.Y., 2009. Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* 315, 2871-2878.
- Liu, S., Edgerton, S.M., Moore, D.H., Thor, A.D., 2001. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1716-1723.
- Lohner, K., 1996. Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chem. Phys. Lipids.* 81, 167-184.

- Lohner, K., Hermetter, A., Paltauf, F., 1984. Phase behavior of ethanolamine plasmalogen. Chem. Phys. Lipids. 34, 163-170.
- López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). Fish Shellfish Immunol. 7, 595-608.
- MacDonald, J.I., Sprecher, H., 1989. Distribution of arachidonic acid in choline- and ethanolamine-containing phosphoglycerides in subfractionated human neutrophils. J. Biol. Chem. 264, 17718-17726.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 163, 221-234.
- Marty, Y., Soudant, P., Perrotte, S., Moal, J., Dussauze, J., Samain, J.F., 1999. Identification and occurrence of a novel cis-4, 7, 10, trans-13-docosatetraenoic fatty acid in the scallop *Pecten maximus* (L.). J. Chromatogr. B 839, 119-127.
- Mason, R.J., Stossel, T.P., Vaughan, M., 1972. Lipids of alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, and their phagocytic vesicles. J. Clin. Investig. 51, 2399-2407.
- Matsubara, T., Hayashi, A., 1973. Identification of molecular species of ceramide aminoethylphosphonate from oyster adductor by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Biochim. Biophys. Acta 296, 171-178.
- May, R.C., Machesky, L.M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. 114, 1061-1077.
- McGladdery, S.E., Reinisch, C.L., MacCallum, G.S., Stephens, R.E., Walker, C.L., Davidson, J.T., 2001. Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. Bull. Aquac. Assoc. Can. 101, 19-26.
- Menendez, J.A., Lupu, R., 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat. Rev. Cancer 7, 763-777.
- Mix, M.C., 1975. Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay, Oregon. J. Invertebr. Pathol. 26, 289-298.
- Mix, M.C., 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. J. Fish. Dis. 6, 239-248.
- Mix, M.C., Hawkes, J.W., Sparks, A.K., 1979. Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. J. Invertebr. Pathol. 34, 41-56.

- Moore, J.D., Elston, R.A., Drum, A.S., Wilkinson, M.T., 1991. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. J. Invertebr. Pathol. 58, 231-243.
- Morand, O.H., Zoeller, R.A., Raetz, C.R., 1988. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. J. Biol. Chem. 263, 11597-11606.
- Morrison, C.M., Moore, A.R., Marryatt, V.M., Scarratt, D.J., 1993. Disseminated sarcomas of soft shell clams, *Mya arenaria* Linnaeus 1758, from sites in Nova Scotia and New Brunswick. J. Shellfish Res. 12, 65-65.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid Res. 5, 600-608.
- Mukhamedova, K.S., Glushenkova, A.I., 2000. Natural phosphonolipids. Chem. Nat. Compd. 36, 329-341.
- Nagan, N., Zoeller, R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. Prog. Lipid Res. 40, 199-229.
- Nagan, N., Hajra, A.K., Larkins, L.K., Lazarow, P., Purdue, P.E., Rizzo, W.B., Zoeller, R.A., 1998. Isolation of a Chinese hamster fibroblast variant defective in dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activity and plasmalogen biosynthesis: use of a novel two-step selection protocol. Biochem. J. 332, 273-279.
- Napolitano, G.E., MacDonald, B.A., Thompson, R.J., Ackman, R.G., 1992. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. Mar. Biol. 113, 71-76.
- Nieto, M.L., Venable, M.E., Bauldry, S.A., Greene, D.G., Kennedy, M., Bass, D.A., Wykle, R.L., 1991. Evidence that hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet-activating factor via a transacylation reaction. J. Biol. Chem. 266, 18699-18706.
- Ordas, M.C., Figueras, A., 2005. Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (*Cerastoderma edule*) in Carril (Galicia, NW Spain). Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 25, 124-130.
- Ottaviani, E., Paeman, L.R., Cadet, P., Stefano, G.B., 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. Eur. J. Pharmacol., Environ. Toxicol. Pharmacol. Sect. 248, 319-324.
- Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C., Cowey, C.B., 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. Lipids 10, 528-531.

- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org. 59, 249-262.
- Paltauf, F., 1983a. Biosynthesis of 1-O-(1'alkenyl)glycerolipids (plasmalogens). In: Mangold, H.K., Paltauf, F. (Eds.), Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects. Academic Press, New York, pp. 107-128.
- Paltauf, F., 1983b. Ether lipids in biological and model membranes. In: Mangold, H.K., Paltauf, F. (Eds.), Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects. Academic Press, New York, pp. 309-353.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., Denko, N.C., 2006. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Cell Metab. 3, 187-197.
- Paradis, M., Ackman, R.G., 1977. Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. Lipids 12, 170-176.
- Parker, R.S., Selivonchick, D.P., 1986. Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 53, 215-228.
- Patra, S.K., 2008. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer 1785, 182-206.
- Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Jude, F., Raymond, N., Bourrasseau, L., Le Goïc, N., Haynes, F., Legeay, A., Paillard, C., 2009. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. Mar. Pollut. Bull. In press.
- Peters, E.C., 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 18, 74-92.
- Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., Sens, P., 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. Nature 459, 379-385.
- Pike, L.J., 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. J. Lipid Res. 44, 655-667.
- Pirini, M., Manuzzi, M.P., Pagliarani, A., Trombetti, F., Borgatti, A.R., Ventrella, V., 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. Comp. Biochem. Physiol. B 147, 616-626.
- Poder, M., Auffret, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. I. Morphology and population survey in Brittany, France. Aquaculture 58, 1-8.

- Portilla, D., Creer, M.H., 1995. Plasmalogen phospholipid hydrolysis during hypoxic injury of rabbit proximal tubules. *Kidney Int.* 47, 1087-1094.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., Castello, P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 332-340.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Steinberg, D., 1988. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2805-2809.
- Rabinovich, A.L., Ripatti, P.O., 1991. The flexibility of natural hydrocarbon chains with non-methylene-interrupted double bonds. *Chem. Phys. Lipids.* 58, 185-192.
- Ramstedt, B., Leppimäki, P., Axberg, M., Slotte, J.P., 1999. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *Eur. J. Biochem.* 266, 997-1002.
- Rasmussen, L.P.D., 1986. Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Mar. Biol.* 92, 59-64.
- Reno, P.W., House, M., Illingworth, A., 1994. Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 163-172.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Rodríguez, H., Soto, M., Arias, C., Estevez, J., 1997. A case of disseminated haemic sarcoma in *Cerastoderma* (= *Cardium*) *glaucum* (Poiret, 1789) collected from Ria de Vigo (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 17, 88-90.
- Romalde, J.L., Luz Vilariño, M., Beaz, R., Rodríguez, J.M., Díaz, S., Villalba, A., Carballal, M.J., 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 95-101.
- Roots, B.I., Johnston, P.V., 1968. Plasmalogens of the nervous system and environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 553-560.
- Rosenberger, T.A., Oki, J., Purdon, A.D., Rapoport, S.I., Murphy, E.J., 2002. Rapid synthesis and turnover of brain microsomal ether phospholipids in the adult rat. *J. Lipid Res.* 43, 59-68.
- Ruggieri, S., Mugnai, G., Mannini, A., Calorini, L., Fallani, A., Barletta, E., Mannori, G., Cecconi, O., 1999. Lipid characteristics in metastatic cells. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 271-276.

- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A., 1997. JC-1, but not DiOC6 (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* 411, 77-82.
- Sargent, J.R., 1989. Ether-linked glycerides in marine animals. In: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*. CRC Press, Boca raton, Florida, USA, pp. 175–197.
- Scherrer, L.A., Gross, R.W., 1989. Subcellular distribution, molecular dynamics and catabolism of plasmalogens in myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 88, 97-105.
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M.L., 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39, 257-288.
- Schrakamp, G., Schutgens, R.B.H., Schalkwijk, C.G., Van Den Bosch, H., 1991. Comparative studies on plasmalogen biosynthesis in rat brain homogenates and isolated oligodendroglial cells during development. *Brain dysfunct.* 4, 217-227.
- Shan, L., Davis, L.D., 2006. Method for detecting an inflammatory disease or cancer. *Frantz Biomarkers, LLC* (Mentor, OH, United States), pp. 30.
- Sherr, C.J., 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Shieh, H.S., 1968. The characterization and incorporation of radioactive bases into scallop phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 533-541.
- Sindermann, C.J., 1990. *Principal diseases of marine fish and shellfish* Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Chen, L.B., 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3671-3675.
- Smolarz, K., Renault, T., Soletchnik, P., Wolowicz, M., 2005. Neoplasia detection in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk: comparison of flow cytometry, histology and chromosome analysis. *Dis. Aquat. Org.* 65, 187-195.
- Snyder, F., Wood, R., 1968. The occurrence and metabolism of alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in transplantable rat and mouse tumors. *Cancer Res.* 28, 972-978.
- Snyder, F., Wood, R., 1969. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res.* 29, 251-257.

- Soudant, P., Chu, F.L.E., Marty, Y., 2000. Lipid class composition of the protozoan *Perkinsus marinus*, an oyster parasite, and its metabolism of a fluorescent phosphatidylcholine analog. *Lipids* 35, 1387-1396.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1995. Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *J. Chromatogr. B* 673, 15-26.
- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., Samain, J.F., 1996. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205, 149-163.
- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., Samain, J.F., 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.) Effect of nutrition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 215, 103-114.
- Soudant, P., Leite, R., Chu, F.L.E., Villalba, A., Cancela, L., 2008. Bivalves-*Perkinsus* spp. interactions. In: Villalba, A. (Ed.), Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry, Vilanova de Arousa, Spain, pp. 78-109.
- Sparks, A.K., 1985. Synopsis of invertebrate pathology: exclusive of insects. Elsevier Science Ltd, New York, 260 pp.
- Sparks, A.K., Morado, J.F., 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *Am. Fisheries Soc. Sp. Publ.* 18, 139-152.
- Stadelmann-Ingrand, S., Favreliere, S., Fauconneau, B., Mauco, G., Tallineau, C., 2001. Plasmalogen degradation by oxidative stress: production and disappearance of specific fatty aldehydes and fatty-hydroxyaldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 31, 1263-1271.
- Stefanov, K., Seizova, K., Brechany, E.Y., Christie, W.W., 1992. An unusual fatty acid composition for a fresh-water mussel, *Unio tumidus*, from Bulgaria. *J. Nat. Prod.* 55, 979-981.
- Storz, P., 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 10, 1881-1896.
- Sunila, I., 1991. Respiration of sarcoma cells from the soft-shell clam *Mya arenaria* L. under various conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 150, 19-29.
- Sunila, I., 1994. Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. In: Rosenfield, A., Kern, F.G., Keller, B.J. (Eds.), *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. US Department of Commerce, Woods Hole, MA, pp. 11-13.

- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H., 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Investig.* 108, 15-23.
- Tiscar, P.G., Mosca, F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.* 28, 57-62.
- Tocher, D.R., Carr, J., Sargent, J.R., 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 94, 367-374.
- Tocher, D.R., Dick, J.R., Sargent, J.R., 1995. Occurrence of 22:3n-3 and 22:4n-3 in the lipids of the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatic tumor cell line, PLHC-1. *Lipids* 30, 555-565.
- Trider, D.J., Castell, J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.* 110, 1303-1309.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1984. A proliferative disorder of possible hemic origin in the common cockle, *Cerastoderma edule*. *J. Invertebr. Pathol.* 44, 109-111.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988. Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.* 5, 225-238.
- Uki, N., Sugiura, M., Watanabe, T., 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 52, 1013-1023.
- Vaskovsky, V.E., 1989. Phospholipids. In: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 199-242.
- Ventrella, V., Pirini, M., Pagliarini, A., Trombetti, F., Manuzzi, M.P., Borgatti, A.R., 2008. Effect of temporal and geographical factors on fatty acid composition of *M. galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 241-250.
- Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F., 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 110-122.
- Vigh, L., Escribà, P.V., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Piotto, S., Maresca, B., Horvath, I., Harwood, J.L., 2005. The significance of lipid composition for membrane activity: New concepts and ways of assessing function. *Prog. Lipid Res.* 44, 303-344.
- Villalba, A., Carballal, M.J., Lopez, C., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 46, 213-216.



## Bibliographie

- Waldock, M.J., Holland, D.L., 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19, 332-336.
- Weinberg, J.R., Leavitt, D.F., Lancaster, B.A., Capuzzo, J.M.D., 1997. Experimental field studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the induction and effect of hematopoietic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 183-194.
- Wolff, R.L., Combe, N.A., Entressangles, B., Morin, O., 1987. Effets comparés de l'acide élaïdique alimentaire sur les chaînes alkynyles et acyles des glycérophospholipides de mitochondries de reins de rats. *Rev. Fr. Corps Gras* 34, 525-532.
- Wood, R., Harlow, R.D., 1969. Structural analyses of rat liver phosphoglycerides. *Arch. Biochem. Biophys.* 135, 272-281.
- Yevich, P.P., Barszcz, C.S., 1977. Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted iites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 298, 409-426.
- Zakhartsev, M.V., Naumenko, N.V., Chelomin, V.P., 1998. Non-methylene-interrupted fatty acids in phospholipids of the membranes of the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Russ. J. Mar. Biol.* 24, 183-186.
- Zhukova, N.V., 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from [14 C] acetate in molluscs. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 878, 131-133.
- Zhukova, N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B* 100, 801-804.
- Zhukova, N.V., Svetashev, V.I., 1986. Non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs from the sea of Japan. *Comp. Biochem. Physiol. B* 83, 643-646.
- Zoeller, R.A., Rangaswamy, S., Herscovitz, H., Rizzo, W.B., Hajra, A.K., Das, A.K., Moser, H.W., Moser, A., Lazarow, P.B., Santos, M.J., 1992. Mutants in a macrophage-like cell line are defective in plasmalogen biosynthesis, but contain functional peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 267, 8299-8306.

# ANNEXE



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)

## Bivalve population health: Multistress to identify hot spots

X. de Montaudouin<sup>a,\*</sup>, I. Paul-Pont<sup>a</sup>, C. Lambert<sup>b</sup>, P. Gonzalez<sup>a</sup>, N. Raymond<sup>a</sup>, F. Jude<sup>a</sup>, A. Legeay<sup>a</sup>, M. Baudrimont<sup>a</sup>, C. Dang<sup>a</sup>, F. Le Grand<sup>b</sup>, N. Le Goïc<sup>b</sup>, L. Bourasseau<sup>a</sup>, C. Paillard<sup>b</sup><sup>a</sup> University Bordeaux 1, EPOC CNRS UMR 5805, Station Marine d'Arcachon, 2 rue du Pr Jolyet, 33120 Arcachon, France<sup>b</sup> University Bretagne Occidentale, IUEM, LEMAR CNRS UMR 6539, Place Copernic, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Bivalves  
Multistress  
Metals  
Parasites  
Immunity  
Metallothionein

## ABSTRACT

This study investigated some stress (metals, parasites) and response (immunity, metallothionein) factors in two cockle and two Manila clam populations. Data from eight seasons were averaged to obtain global baseline values. Stress/response characteristics of each population were compared to population health status that was determined through population dynamics parameters. Four different scenarios were discussed: (1) a lightly stressed cockle population with correct population health but with a risk of deterioration (hot spot); (2) a lightly stressed introduced cockle population threatened of extinction. In this case ecological factors were suspected; (3) a moderately stressed clam population with moderate adaptive response. The population was sustainable but the level of stress should not increase (hotspot); and (4) a stressed clam population and unfavourable ecological conditions preventing clam settlement. This monitoring highlighted that the discrepancy between population health and stress levels could be due to insufficient response by bivalves and/or by unfavourable ecological factors.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The contamination of natural waters by heavy metals and microbial pathogens as a result of human activities affects aquatic life and poses a high environmental concern (Byrne and O'Halloran, 2001). Coastal ecosystems, because of the proximity of pollution output and of their biological productivity, are particularly vulnerable to these pollutants and to pathogens that directly affect populations. Coastal benthic fauna is often dominated by molluscs in terms of biomass (Reise et al., 1994; Bolam et al., 2002; Blanchet et al., 2004). Bivalve molluscs are widespread and often sedentary. They fulfil the qualities of an ideal sentinel organism (Sures, 2004): they have a wide geographical distribution, are sensitive to many contaminants but tolerant of a large range of abiotic factors and can be maintained and experimented on the laboratory. In most cases, bivalves are good accumulators of organometallics in the environment due both to their behaviour and mode of feeding (suspension feeders).

The responses of estuarine and marine organisms to waste input are manifold, but can mainly be classified on five levels of biological organization, i.e. molecular, cellular, organismal, population and community (Verlecar et al., 2006). The present study covered the scale from the molecule to the population and aims to assess the correlation between environmental stress, bivalve response

and overall population performances and to appraise environmental health.

Three categories of stressors were measured – metals (Cd, Cu, Zn), microparasites (*Perkinsus olseni*) or disease signs due, or hypothesised to be due to microparasites (BRD, brown ring diseases; BMD, brown muscle disease) and macroparasites (digenean trematodes) – in two bivalve species, the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), and in three Atlantic French sites (Inner Arcachon Bay, Outer Arcachon Bay, Landéda coast). The three metals were selected because our preliminary analyses reported significant concentrations in bivalves in one of our sites in Arcachon Bay. Manila clam culture in Western Europe has suffered a serious vibriosis problem since the late 1980s. The etiological agent, responsible for brown ring disease (BRD) was identified as a *Vibrio* sp., named P1 and later described as *Vibrio tapetis* (see review (Paillard, 2004)). Recently, brown muscle disease was described at Arcachon with high local prevalence and was thought to be due to viral particles (Dang et al., 2008, 2009a). Perkinsosis, among molluscan diseases, has resulted in the most severe economic losses (Villalba et al., 2004; Carnegie, 2005). *Perkinsus olseni* occurs in Manila clams along the whole French coast (Lassalle et al., 2007). Digenean parasites are omnipresent in cockles (de Montaudouin et al., 2009) and may cause loss of production (Desclaux et al., 2004; Gam et al., 2009) while they remain scarce in the introduced species, the Manila clams (Lassalle et al., 2007; Dang et al., 2009b).

\* Corresponding author. Tel.: +33 56223904; fax: +33 56835184.

E-mail address: [x.de-montaudouin@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:x.de-montaudouin@epoc.u-bordeaux1.fr) (X. de Montaudouin).

In common with many invertebrates, host defence in bivalves is largely non-specific, based on activities of circulating hemocytes in the soft tissues and in extrapallial fluid between the mantle and the inner face of the shell (Allam and Paillard, 1998). Hemocyte defence functions include phagocytosis, encapsulation and wound repair, synthesis of humoral defence factor and lytic activity of bivalve lysozyme (Cheng, 1996, 2000; Allam et al., 2000; Chu, 2000; Canesi et al., 2002). Metallothioneins (MT) respond to trace metals (Kägi, 1991; Baudrimont et al., 2003; Amiard et al., 2006) but can also be induced by other environmental tensions triggering inflammation and oxidative stress (Baudrimont et al., 1997, 2006). Upstream, the expression of different genes like superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) are thought to contribute to detoxification and others contribute to functioning of the innate immunological system (Gestal et al., 2008).

Different scenarios are possible that can be summed up within two alternatives (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). (1) Sources of stress are considered as negligible, no particular adaptive response is present and the population parameters (reproduction, growth) should be at normal level. If the population production is low, other regulation factors intervene. (2) Some stressors are identified at a level that is considered as high, leading to adaptive physiological responses with two alternatives:

- short-term stress leading to rapid response of the organism affecting bivalve physiology without impairing population dynamics parameters;
- long-term stress affecting fitness of the organism. The capability (or not) of bivalves to overcome this situation will result in a more or less efficient adjustment of population dynamics parameters.

The strategy of the present work was to monitor seasonally (four times a year, during 2 years) four populations (Manila clams and cockles at Arcachon and Landéda) that could illustrate these different scenarios. Seasons, and life-cycle of bivalves in particular, largely interact in the expression of biomarkers that are also influenced not only by stressors, but also by the global metabolism of organisms. For example, immune parameters are reputed to exhibit seasonal variation (Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009). Consequently, prior to the correct use of biomarkers it is essential to know the ranges of natural variability in their levels. Depending on food availability, reproductive status, growth-dilution with season and some other factors, the levels of pollutants in tissues and biomarker responses may fluctuate extensively during the year. As a result, changes in biomarker levels may simply be a natural part of the annual physiological cycle and thus quite unrelated to changes in exposure to chemical pollution (Leiniö and Lehtonen, 2005; Baudrimont et al., 2007).

In this interdisciplinary approach, median, maximum and minimum values of contaminant and parasite burdens and of stress biomarkers will be given and compared to what is known. All seasons will be pooled in order to obtain a chronic and averaged overview of stresses and bivalve responses within 2 years. Concomitantly, when available, population parameters will be estimated. When both ecological and ecotoxicological indicators were good, we could be confident in concluding that the ecosystem was healthy. Conversely, when both indicators exhibited degradation in individuals and populations, we reached the conclusion that the ecosystem was disturbed (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). In case of disruption between both indicators, adaptation, compensation or genetic selection of organisms can be evoked (Gestal et al., 2008) as well as unfavourable ecological conditions (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Target bivalves

To evaluate the specificity of the various factors, two bivalve species were selected. The cockle *C. edule* is an indigenous exploited bivalve living in semi-sheltered marine systems along the north-eastern coast of Atlantic. This species has previously been applied as bioindicator of metal contamination (Cheggour et al., 2001) and as a test organism in studies concerning metal accumulation (Baudrimont et al., 2006), biomarker expression (Desclaux-Marchand et al., 2007; Paul-Pont et al., 2007) or parasite infection (Thieltges and Reise, 2006; Lassalle et al., 2007; de Montaudouin et al., 2009). The Manila clam *R. philippinarum* is an introduced (since 1972) and exploited species along the French coast. This is the second most exploited bivalve in the world, after the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Its large geographical distribution makes it a good model in ecotoxicology of coastal systems (Ji et al., 2006; Veltman et al., 2008). In terms of infectious pathology, Manila clams are severely impacted by several diseases, including brown ring disease (Paillard et al., 1997; Allam et al., 2002), Perkinsosis (Hamaguchi et al., 1998; Elandalloussi et al., 2008; Park et al., 2008) and brown muscle disease (Dang et al., 2008; Dang and de Montaudouin, 2009). However, the Manila clam is generally free of heavy trematode infection (Dang et al., 2009b).

### 2.2. Sampling sites

Bivalves were collected seasonally in three different intertidal sites (Fig. 1, Table 1). Cockles were sampled at Banc d'Arguin and Landéda, France. Banc d'Arguin is a sandy bank at the entrance of Arcachon Bay. Cockle abundance ranges from 100 to 200 ind m<sup>-2</sup>. Landéda site is a muddy sand bay which is well-known due to the important venerid culture of the Manila clams in this site before the BRD event in 1987. Because of clam mass mortality in this site, we worked on recently introduced clams from Morbihan Gulf Island ("Ile aux Oiseaux"). Cockles studied in Landéda came from a park but had originally been seeded from Le Croisic (France) early in 2006. Finally, Manila clams were also sampled at Andernos, an inner site of Arcachon Bay (Fig. 1). Sediment at the sampling station was fine sand covered by a *Zostera noltii* bed. Clam abundance is usually under 60 ind m<sup>-2</sup> (Dang et al., 2010).

The locations of Banc d'Arguin and Andernos will both be called 'Arcachon' in the following text along with Landéda to denote the third site.

### 2.3. Sampling and methodology

From January 2007 to December 2008, 30 clams and cockles were collected seasonally (eight seasons) at the three sites (two in Arcachon Bay and one at Landéda). First, the shell-length structure of the different populations was seasonally determined. Six 0.25-m<sup>2</sup> quadrates were randomly collected and sieved through 1-mm mesh. Individuals were sorted and shell length was measured with a calliper to the nearest mm. The mean annual population structure gives information about recruitment, abundance and maximal length.

Secondly, adults from the dominant length class were selected by hand, i.e. 31–35-mm range for cockles and 36–39-mm range for clams. Individuals were carefully brought back to the laboratory for immediate analysis. Two series of individuals were dissected: series n°1 consisted of 20 animals and series n°2 of 10 animals. Different parameters were individually analysed according to the series (n°1 or n°2) (Table 2).

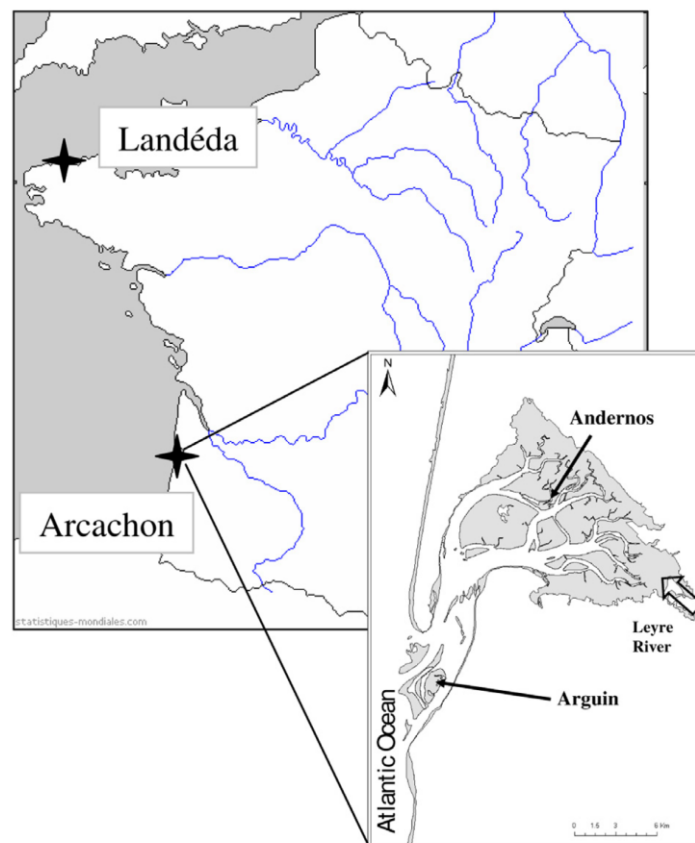


Fig. 1. Location of the sampling sites: "Banc d'Arguin" and "Andernos" in Arcachon Bay, and Landéda in Brittany.

**Table 1**  
Characteristics of the different investigated sites.

Parameters	Arcachon		Landéda
	Banc d'Arguin (cockle)	Andernos (clam)	(Cockle & clam)
Position	44°34'N 01°15'W	44°42'N 01°08'W	48°35'N 04°35'W
Salinity range (psu)	34–35	19–35	34–35
Sediment temperature range (°C)	–1.4 to 30.1	–1.0 to 36.6	5.7–41.7
Sediment temperature year average (°C)	14.9	15.3	13.4
Sediment grain-size median (µm)	360	160	300
Immersion rate (%)	60	60	50

Among analysed parameters, some were not included in the present paper: (1) we attempted to measure  $PO_2$  with optodes in heart blood (Series 1), just after opening the shell. However, baseline levels in these bivalve species were too low to discern any variations between sites, seasons or species ( $<0.2$  kPa). (2) We measured the expression of three genes that are involved in mitochondrial metabolism (*cox I*), response to oxidative stress (*sod*) and

detoxification (*mt*). However, we considered that among physiological processes involved in response to stress, genes regulation is set up upstream of other biochemical pathways and is a transient response to acute stress. Consequently, this bore no relation to average values observed seasonally, in response to chronic stresses. These two parameters were maintained in Table 1 to get an overview of the complete analysis methodology.

The different methods used to estimate individual parameters are detailed below.

### 2.3.1. Condition index

Condition index was measured on 20 animals as the ratio of the dry flesh weight (in mg) to the shell dry weight (in g) (Walne and Mann, 1975).

### 2.3.2. Brown ring disease

The severity of brown ring disease is scored by the severity of a symptom, which is the extent of the conchiolin deposit and whether there is evidence of recovery in the form of calcium carbonate layered over the deposit (Paillard and Maes, 1994). The Conchiolin Deposit Stage (CDS) is scored from 0 to 7 with 7 being the most extensive deposits. BRD prevalence was the only measured parameter in the present analysis and corresponded to the



**Table 2**

List of the parameters measured individually at each site and each date for the two target species (Manila clam *Ruditapes philippinarum* and cockle *Cerastoderma edule*). Organs are precised. The number of analysed animals is given for each parameter.

Individual parameters	Series n°1 (20 animals)	Series n°2 (10 animals)
Condition index	x	x
Disease status		
BRD <sup>*</sup> prevalence (shell)	x	x
BMD <sup>*</sup> prevalence (muscle)	x	x
Perkinsus load (gill)	x	–
Trematodes load (whole flesh)	x	x
Metal dosage (gills and digestive gland)		
Cadmium (Cd)	–	x
Copper (Cu)	–	x
Zinc (Zn)	–	x
Partial oxygen pressure (PO <sub>2</sub> ) (heart) <sup>**</sup>	x	–
Gene expression (gills and digestive gland)		
Cytochrome oxidase (cox) <sup>†</sup>	–	x
Superoxide dismutase (sod) <sup>**</sup>	–	x
Metallothionein (mt) <sup>**</sup>	–	x
Metallothionein (gills and digestive gland)	–	x
Hemocyte parameters		
Total hemocyte count (THC)	–	x
Granulocyte concentration (GR)	–	x
Granulocyte percentage (% GR)	–	x
Hyalinocyte concentration (HY)	–	x
Single cell concentration (S)	–	x
Aggregated cell concentration (Agg)	–	x

<sup>\*</sup> BRD, brown ring disease; BMD, brown muscle disease.

<sup>\*\*</sup> Measured but not included in the present paper (see Section 2).

number of clams exhibiting CDS from 1 to 7 divided by the number of total clams examined.

### 2.3.3. Brown muscle disease

This disease concerns Manila clam only and was recently described (Dang et al., 2008, 2009a). Necrosis of the posterior muscle, the most obvious clinical sign of BMD, was explored in all dissected animals.

### 2.3.4. *P. olseni* load

The two branchial lamellae from one side of each of the 20 clams or cockles sampled were excised, weighed, and incubated in Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM, Ray (Ray, 1966)) for 7 days in the dark at room temperature. Gill tissues incubated in RFTM were then removed and prepared according to the protocol of Choi et al. (1989). Briefly, gill tissues were centrifuged (800g, 10 min) to remove medium, digested with NaOH (2 N, 1 h at 60 °C, twice) and followed by two washes in PBS (0.1 M). Finally, the pellet was re-suspended in 1 mL of PBS. Ten microlitres of Lugol's solution were added, and the number of *P. olseni* hypnospores was assessed using a Nageotte chamber under the light microscope. The level of infection by *P. olseni* (=Perkinsus load) was presented as the number of hypnospores per gram of gill tissue.

### 2.3.5. Trematode diagnosis

The flesh was squeezed between two large glass slides and observed under stereomicroscope to identify and count trematode utilizing the bivalve as second intermediate host (metacercariae). For each bivalve species, shell-length classes were similar between sites (Table 2) in order to avoid host size being a confounding factor in parasite abundance assessment. Identification was made following de Montaudouin et al. (2009). When an individual was utilized as first intermediate host, its tissues were completely invaded by sporocysts. This generally occurs in less than 10% of the population (Desclaux et al., 2002; de Montaudouin et al., 2009). These individuals were discarded. Results were expressed as total number of metacercariae per host individual.

### 2.3.6. Metal analysis

Metal quantification was carried out for gills and visceral mass of bivalves. Dry weights of tissues were determined before being broken down in 1–1.5 mL (depending on weight of tissue) of nitric acid (Fluka; Buchs, Switzerland, 65% HNO<sub>3</sub>) at 100 °C for 3 h to dissolve metals in the liquid for quantification. Metal concentrations were determined by atomic absorption spectrometry according to protocols described by Baudrimont et al. (2006).

The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard biological reference materials (Tort-2: Lobster hepatopancreas and Dolt-3: Dogfish liver from National Research Council of Canada, Ottawa). Mean values of Tort-2 and Dolt-3 were consistently within certified ranges.

### 2.3.7. Metallothionein analysis

As soon as bivalves were dissected, gills and visceral mass were placed into polyethylene bags (Whirl-Pak) under N<sub>2</sub> atmosphere at –80 °C to minimize metallothionein oxidation until analysis was carried out. The concentration of total MT protein was determined in tissues of bivalves by the mercury-saturation assay, using cold inorganic mercury according to a protocol already described by Baudrimont et al. (1997). This technique is based on the quantification of Hg bound to the saturated MT. Hg concentrations were determined by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic). The detection limit was estimated at 0.01 ng Hg. As the exact quantity of Hg binding sites per MT molecule being unknown for these species, MT concentrations were expressed in nmol sites Hg g<sup>–1</sup> (fw).

### 2.3.8. Immunological parameters

Hemolymph was withdrawn from the adductor muscle of each individual clam or cockle with an adapted needle attached to a 1-mL syringe, then passed through 80 µm mesh, and stored temporarily in a microcentrifuge tube on crushed ice to retard cell clumping.

For each individual hemolymph sample, the following parameters were calculated by Flow Cytometry (FCM): total hemocyte count (cell mL<sup>–1</sup>), single cell concentration (cell mL<sup>–1</sup>), aggregated cell concentration (cell mL<sup>–1</sup>), granulocyte and hyalinocyte concentration (cell mL<sup>–1</sup>) and finally the percentage of granulocyte among single cells (%). FCM analysis were performed on a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) flow-cytometer equipped with a 488 nm argon laser and located in Brest. Procedures for characterization of hemocytes were adapted from those of Marie et al. (1999), Delaporte et al. (2003), Soudant et al. (2004) and Lambert et al. (2007).

### 2.3.9. Data analysis

The objective was to obtain average annual values, including natural seasonal range. Due to heterogeneity of variances, median and quartiles were calculated for each parameter and comparisons between sites/species were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test (Sokal and Rohlf, 1981). Two Principal Component Analysis (PCA) were also conducted with median values, one to display stress factors (metacercariae of the four dominant trematode species, *Perkinsus*, Cu–Zn–Cd in digestive gland and gills, brown ring disease) and the other to display response factors (metallothioneins in digestive gland and gills, immunological parameters). Both PCAs were separated for better readability.

## 3. Results

### 3.1. Stress factors

#### 3.1.1. Trematode diagnosis

The median number of metacercariae was below 46 per cockle at Arcachon and Landéda (KW test,  $p > 0.05$ ) (Table 3). The higher

**Table 3**  
Values of the parameters measured in cockles (*Cerastoderma edule*) and Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) in both sites, Arcachon and Landéda. Minimum and maximum values are between brackets. Populations (a, b, c, d) are compared each other with Kruskal–Wallis test ( $\alpha = 0.05$ ), ns, not significant ( $p > 0.05$ ); BRD, brown ring disease; VM, visceral mass; THC, total hemocytes count; dw, dry weight; ww, et weight. The median number of metacercariae per individual host is given for the four dominant species and for the totality of trematode species.

Parameters	Cockle		Manila clam		$\alpha = 0.05$
	Arcachon (a)	Landéda (b)	Arcachon (c)	Landéda (d)	
Shell length (mm)	34 (33–35)	33 (31–34)	37 (37–39)	37 (36–39)	a = b c = d
Stress					
<i>H. elongata</i> (per individual)	0 (0–0)	14 (10–38)	0 (0)	0 (0)	a = c = d b = c = d
<i>H. interrupta</i> (per individual)	5 (0–24)	0 (0–3)	0 (0)	0 (0)	a = b = c c = d
<i>C. argentea</i> (per individual)	3 (1–27)	2 (0–8)	0 (0–15)	0 (0)	a = b c = d
<i>M. minutus</i> (per individual)	30 (0–311)	8 (0–20)	0 (0)	0 (0)	a = b c = d
Total trematodes (per individual)	46 (4–359)	26 (16–63)	0 (0–0)	0 (0–0)	a = b c = d
<i>Perkinsus</i> (cells $g^{-1}$ gills ww)	0 (0–1)	2 (0–8)	$10 \times 10^4$ ( $6 \times 10^4$ – $15 \times 10^4$ )	$8 \times 10^3$ ( $2 \times 10^3$ – $80 \times 10^3$ )	a = b c = d
BRD (%)	0 (0–0)	0 (0–0)	5 (1–19)	33 (20–75)	a = b = c c = d
Gill cadmium ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	690 (421–1366)	982 (490–2276)	374 (401–107)	515 (236–740)	a = b c = d
VM cadmium ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	228 (143–507)	233 (104–411)	916 (546–1297)	323 (246–855)	a = c = d a = b = d
Gill zinc ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	$8 \times 10^4$ ( $6 \times 10^4$ – $11 \times 10^4$ )	$8 \times 10^4$ ( $6 \times 10^4$ – $9 \times 10^4$ )	$8 \times 10^4$ ( $6 \times 10^4$ – $9 \times 10^4$ )	$9 \times 10^4$ ( $7 \times 10^4$ – $11 \times 10^4$ )	ns
VM zinc ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	$6 \times 10^4$ ( $4 \times 10^4$ – $7 \times 10^4$ )	$4 \times 10^4$ ( $3 \times 10^4$ – $6 \times 10^4$ )	$8 \times 10^4$ ( $8 \times 10^4$ – $9 \times 10^4$ )	$6 \times 10^4$ ( $6 \times 10^4$ – $8 \times 10^4$ )	a = b = d c = d
Gill copper ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	$7 \times 10^3$ ( $4 \times 10^3$ – $10 \times 10^3$ )	$12 \times 10^3$ ( $8 \times 10^3$ – $14 \times 10^3$ )	$12 \times 10^3$ ( $6 \times 10^3$ – $18 \times 10^3$ )	$11 \times 10^3$ ( $6 \times 10^3$ – $14 \times 10^3$ )	a = c = d b = c = d
VM copper ( $ng\ g^{-1}$ , dw)	$4 \times 10^3$ ( $3 \times 10^3$ – $8 \times 10^3$ )	$3 \times 10^3$ ( $2 \times 10^3$ – $6 \times 10^3$ )	$17 \times 10^3$ ( $11 \times 10^3$ – $21 \times 10^3$ )	$11 \times 10^3$ ( $8 \times 10^3$ – $13 \times 10^3$ )	a = b, a = d c = d
Gill MT (Eq nmol sites $Hg\ g^{-1}$ , ww)	3 (3–5)	2 (1–6)	7 (2–12)	2 (1–5)	a = b = d a = c = d
VM MT (Eq nmol sites $Hg\ g^{-1}$ , ww)	30 (10–48)	13 (3–26)	26 (13–60)	20 (10–29)	a = c = d b = d
THC (cell $ml^{-1}$ )	$3 \times 10^5$ ( $1.10^5$ – $7.10^5$ )	$6 \times 10^5$ ( $2 \times 10^5$ – $18 \times 10^5$ )	$4 \times 10^5$ ( $3 \times 10^5$ – $5 \times 10^5$ )	$8 \times 10^5$ ( $4 \times 10^5$ – $10 \times 10^5$ )	a = b = c b = c = d
Granulocytes (%)	58 (49–73)	67 (57–94)	48 (43–65)	57 (39–79)	ns

variability recorded at Arcachon was due to high abundance of *Curtuteria arguinae* at the beginning of the survey. The trematode community is dominated by *Meiogymnophallus minutus* (Table 3). At Landéda, the dominant species was another echinostomatid trematode, *Himasthla elongata*. Manila clams were insignificantly infected by trematodes.

Cockles only were infested as first intermediate host, by *Bucephalus minimus*, with prevalence of 1.6% and 2.7% at Arcachon and Landéda, respectively. These individuals were discarded from our samples.

### 3.1.2. *Perkinsus* abundance

*Perkinsus* load is strongly linked to the target species (Table 3). Clams were more infected ( $5 \times 10^4$  hyphospores  $g^{-1}$  wet gill) than cockles (1 hyphospore  $g^{-1}$  wet gill) ( $p < 0.05$ ). Clams from Arcachon exhibited a *Perkinsus* load 12 times greater than those from Landéda (99000 vs. 8000 hyphospores  $g^{-1}$  wet gill).

### 3.1.3. Brown ring disease

Only Manila clams from Landéda were seriously affected by brown ring disease (Table 3). The median BRD prevalence year-round was 33%. In clam from Arcachon, median BRD prevalence was 5%.

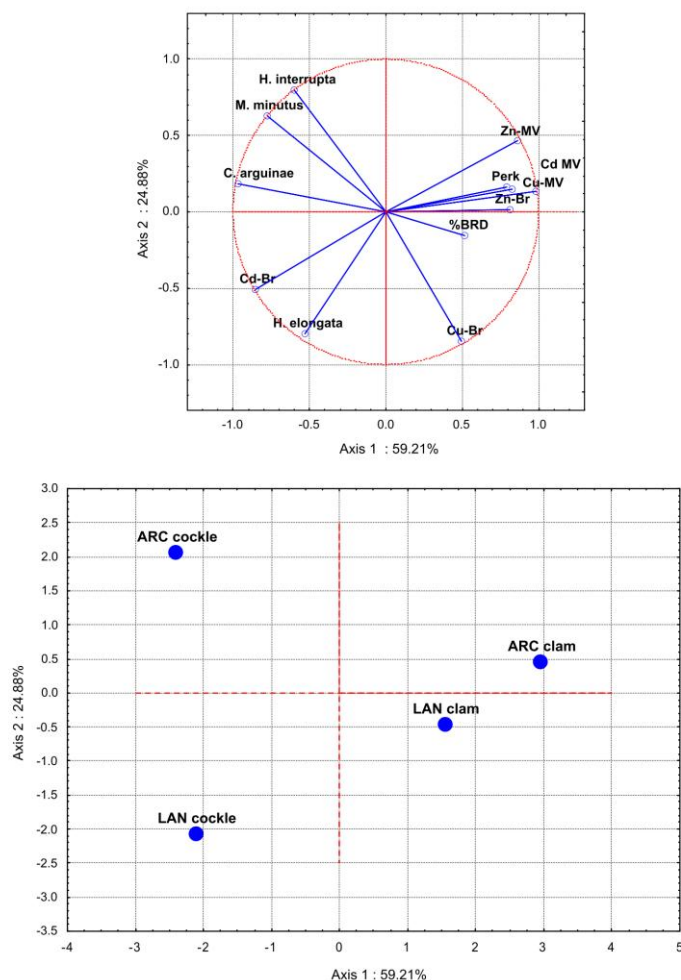
In cockles from the two sites, no BRD signs were observed.

### 3.1.4. Brown muscle disease

None of our samples presented a posterior muscle necrosis, the most obvious clinical sign of BMD.

### 3.1.5. Metal dosage

Metals concentrations (Cd, Cu, Zn) in the visceral mass of bivalves displayed similar trends whatever the metal was (Table 3). In this tissue, highest metal content was systematically found in clams compared to cockles. A significant site effect highlighted



**Fig. 2.** Principal Component Analysis 1 (Stress factors). Loading of stress factors (a) and bivalve populations (b) on the two first principal components (F1–F2). % BRD, prevalence of brown ring disease; VM, visceral mass; Perk, *Perkinsus* intensity; ARC, Arcachon; LAN, Landéda.



higher metal content in bivalves (and particularly in Manila clams) from Arcachon compared to those from Landéda.

Conversely, fluctuations in gill metal contents among species and sites were metal dependent. Although Cu contents were similar between species, cockles displayed higher Cd concentrations and lower Zn concentrations than clams. Considering site differences, zinc concentration in the gills of the bivalves was similar at Landéda and Arcachon whereas Cd and Cu contents were higher in gills of bivalves from Landéda compared to Arcachon.

Globally, median values of metal concentration were higher in gills than in the visceral mass of bivalves except for clams from Arcachon which were characterized by higher Cd and Cu contents in visceral mass in comparison with gills.

### 3.1.6. Principal Component Analysis

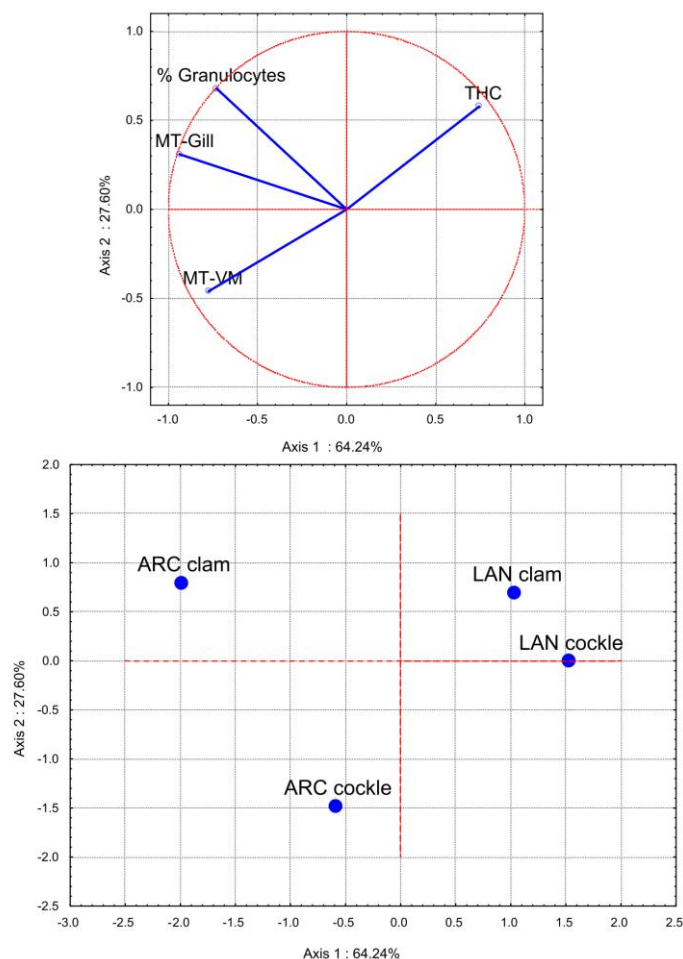
Principal Component Analysis separated three populations according to stress factors (Fig. 2). The two first axes account for

84% of inertia. Manila clams from Landéda were principally characterized by the development of brown ring disease. Manila clams from Arcachon were mainly separated by Perkinsosis infection and metal contamination in the digestive gland. Cockles from the two different locations, Landéda and Arcachon formed a single group along Axis 1, characterized by trematode infection and Cd contamination in gills (for Landéda). Axis 2, for cockles, discriminated both sites according to trematode species (*H. elongata* at Landéda, *M. minutus* and *Himasthla interrupta* at Arcachon).

### 3.2. Response parameters

#### 3.2.1. Metallothioneins

For both species, a site effect occurred on MT concentrations (Table 3): highest values were found at Arcachon in both gills and visceral mass. Within each site, there was no difference in the average concentration of MT between species.



**Fig. 3.** Principal Component Analysis 2 (Responses). Loading of responses (a) and bivalve populations (b) on the two first principal components (F1–F2). MT, metallothionein; VM, visceral mass; THC, total hemocytes count; ARC, Arcachon; LAN, Landéda.

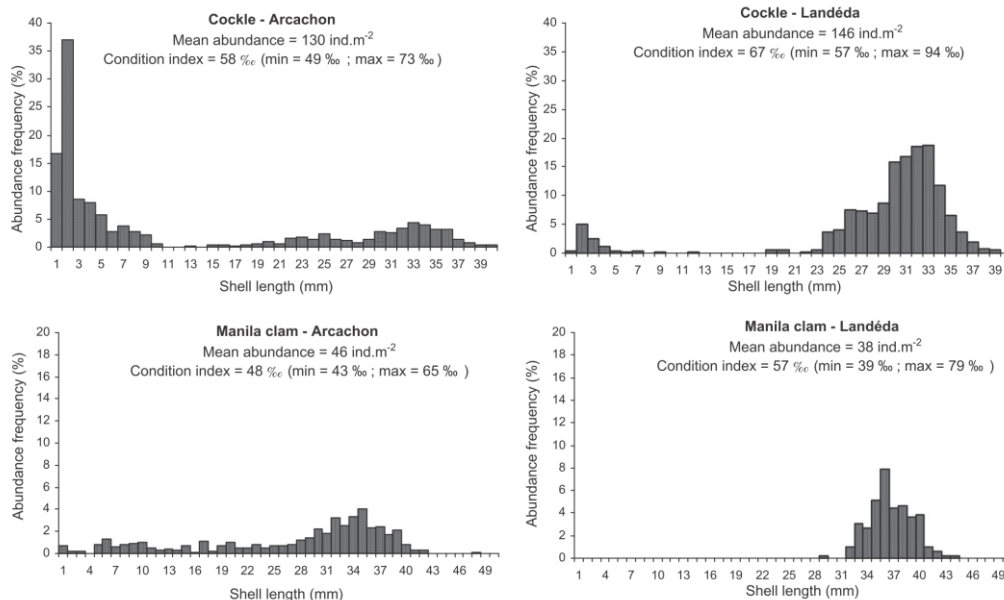


Fig. 4. Averaged shell-length structure (mm) and condition index (CI) of bivalve populations over eight seasons.

### 3.2.2. Immunological parameters

Among the different immunological parameters that were analysed, total hemocyte count (THC) was correlated with granulocytes, hyalinocytes, single cells and aggregated cells concentrations ( $R > 0.82$ ,  $p < 0.05$ ). Therefore, THC and granulocyte percentage (% GR) only were included for further analysis.

A site effect can be shown looking at THC (Table 3): hemolymph from bivalves reared at Landéda showed 1.8 times more hemocytes than in bivalves from Arcachon ( $6.8 \times 10^5$  vs.  $3.8 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>). Conversely, no significant difference occurred among species ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.3. Principal Component Analysis

The first Axis of PCA (64% inertia) separated both sites whereas Axis 2 separated species (28% inertia) (Fig. 3). At Landéda, clams and cockles were relatively near (in terms of response) due to higher THC and lower MT concentrations in gills and visceral mass. Clams from Arcachon were characterized by high MT concentrations in gills and, to a lesser extent, a higher % GR than in other populations. Finally, Arcachon clams were isolated because they exhibited the lowest THC and the highest MT concentrations in the visceral mass.

### 3.3. Condition index, population structure

Mean condition index of cockles was similar at both locations as was condition index of Manila clams (Fig. 4). However, bivalves at Landéda displayed higher fluctuations (minimum and maximum) suggesting more intense gametogenesis.

Population structure (year average) differed between the four studied populations. Cockles from Arcachon displayed a recruitment peak, a mean abundance of 130 ind m<sup>-2</sup> and an asymptotic 40-mm shell length. At Landéda, the introduced cockle population was dense in terms of adult population (130 ind m<sup>-2</sup>) but charac-

terized by a lack of recruitment. Manila clam gathered at Arcachon included rather small adults (most of them <40-mm shell length) and no recruitment peak occurred. All size classes were represented by few individuals. Manila clams that were introduced at Landéda had also gathered a medium shell length and no recruitment at all occurred.

## 4. Discussion

The aim of the present analysis was to assess the averaged status of four different populations (including two bivalve species, the cockle *C. edule* and the Manila clam *R. philippinarum*) in terms of assimilated stressors (parasites, metals), levels of response at molecular (metallothionein) and cellular (hemocytes) scales, and population health (sustainability). In the following text, the terms 'stress' and 'adaptive response' will be restricted to the parameters that were measured, and 'ecological' or 'environmental factors' will incorporate parameters such as temperature, salinity, sediment grain-size, and hydrodynamics. Population health was assessed in terms of condition index, recruitment, density and asymptotic shell length. By pooling seasonal results from a 2-year survey, a baseline of the different measured parameters was obtained for different situations and allowed four different scenarios linking stress levels to population health to be described (Fig. 5).

Cockles from Arcachon were characterized by a low level of the analysed stressors (Fig. 5). The median number of metacercariae was 46. The dominant species was *M. minutus*. The abundance of this trematode can easily overpass 1000 metacercariae per cockle (de Montaudouin et al., 2009) and effects on populations may occur when it reaches 400 metacercariae per cockle (Gam et al., 2009). The abundance of the other trematodes were low compared to what was observed elsewhere (de Montaudouin et al., 2009) and was below the threshold beyond which mortality was observed (Desclaux et al., 2004, 2006; Gam et al., 2009). The intensity of

ARCACHON COCKLE	LANDEDA COCKLE	ARCACHON MANILA CLAM	LANDEDA MANILA CLAM
<b>Stress</b> Trematode-----Low ☺ Perkinsus-----Low ☺ BRD-----Null ☺ BMD-----Null ☺ Cadmium-----Low ☺ Zinc-----Low ☺ Copper-----Low ☺	<b>Stress</b> Trematode-----Low ☺ Perkinsus-----Low ☺ BRD-----Null ☺ BMD-----Null ☺ Cadmium-----Low ☺ Zinc-----Low ☺ Copper-----Low ☺	<b>Stress</b> Trematode-----Low ☺ Perkinsus-----Medium ☹ BRD-----Low ☺ BMD-----Low ☺ Cadmium-----Medium ☹ Zinc-----Medium ☹ Copper-----Medium ☹	<b>Stress</b> Trematode-----Low ☺ Perkinsus-----Medium ☹ BRD-----High ☹☹ BMD-----Null ☺ Cadmium-----Medium ☹ Zinc-----Medium ☹ Copper-----Medium ☹
<b>Response</b> MT-----Medium ☺ THC-----Low ☺ Granulocytes-----Medium ☺	<b>Response</b> MT-----Low ☺ THC-----Medium ☺ Granulocytes-----Medium ☺	<b>Response</b> MT-----Medium ☺ THC-----Low ☹ Granulocytes-----Medium ☺	<b>Response</b> MT-----Low ☹ THC-----Low ☹ Granulocytes-----Medium ☺
<b>Population health</b> CI-----Medium ☹ Recruitment-----Medium ☹ Density-----Medium ☹ Shell length-----High ☺	<b>Population health</b> CI-----High ☺ Recruitment-----Null ☹☹ Density-----High ☺ Shell length-----High ☺	<b>Population health</b> CI-----Low ☹ Recruitment-----Low ☹ Density-----Medium ☹ Shell length-----Medium ☹	<b>Population health</b> CI-----Medium ☹ Recruitment-----Null ☹☹ Density-----Medium ☹ Shell length-----Medium ☺
<b>Conclusion</b> Population without identified stress. Population health is correct but some environmental features do not authorize full development. ☺	<b>Conclusion</b> Population with low identified stress but without recruitment. Unfavourable environment. ☹☹	<b>Conclusion</b> Population with identified stress and consecutive response. Population health is poor but sustainable. ☹	<b>Conclusion</b> Population with identified stress and consecutive low response. Population health is poor and not sustainable. ☹☹

**Fig. 5.** Four different scenarios (see text in discussion) corresponding to four different bivalve populations (from left to right). ☺, low level of stress, or adequate response to stress, or good value of dynamics parameter, or healthy population; ☹, no comment, or lack of knowledge; ☹☹, medium level of stress (moderate impact on individuals), or default of response, or low value of a dynamics parameter, or moderate health statuses of the population; ☹☹☹, severe stress (may lead to mortality), or very low value of a dynamic parameters, or very bad health status of the population (that can be due to at least one very bad value of a single dynamics parameter).

*Perkinsus* in cockles was almost null, i.e. 2 hyphospores  $g^{-1}$  wet gill, as usual in this species (Lassalle et al., 2007). The diseases of the Manila clam, BMD and BRD, did not affect cockles. In terms of metals (Cd, Zn, Cu), concentration values were low and under what is expected to affect cockle health (Jung et al., 2006). In this context of low stress, no particular response from the organisms was expected. Metallothionein (MT) median concentration was medium compared to what was previously observed by (Baudrimont et al., 2006) and the high differences between minimum and maximum was certainly triggered by the reproductive cycle (Kägi, 1991; Baudrimont et al., 2006). In this cockle population, THC fluctuated between  $1 \times 10^5$  and  $7 \times 10^5$  cells  $mL^{-1}$ , in accordance with other field values (Wootton et al., 2003) but under values that were observed at Landéda (ca.  $17 \times 10^5$  cells  $mL^{-1}$ ). There is no available data about the baselines of hemocytes parameters in the cockle *C. edule*, but values seem low compared to what can be observed for example in *R. philippinarum* (Allam et al., 2000; Reid et al., 2003; Hégaret et al., 2007; da Silva et al., 2008) and compared to cockles from the site of Landéda (this study). Condition index (CI) of adult cockles from Arcachon fluctuated with reproductive status but was rather low (median = 58%, max = 73%) compared to Landéda (median = 67%) and other sites where it easily reached 100–130% (Guillou et al., 1990). However, this CI can display lower values (median ≈ 50%) in other systems like in the contaminated Oued Souss estuary (Bergayou et al., 2009). Recruitment peak during both investigated years reached about 45 juveniles  $m^{-2}$  for the 2-mm shell-length class whereas it can reach several thousand (Ducrottoy et al., 1991). As well, mean abundance (130 ind  $m^{-2}$ ) was moderate compared to other populations where it attained more than 1000 ind  $m^{-2}$  (Bachelet et al., 1992; Jensen, 1992;

Gam, 2008). Conversely, asymptotic length was in the high range (40 mm) of what is generally expected (Bourget and Brock, 1990; Gam et al., 2009). The conclusion in this situation (cockles at Arcachon) is that the population dynamics can be inhibited by environmental factors different from our measured stress factors, with no obvious molecular and cellular response. However, in this case, the population remains sustainable.

As at Arcachon, cockles from Landéda underwent low identified stress (see cockle from Arcachon for discussion) (Fig. 5). Surprisingly, the higher copper concentration in gills at Landéda compared to Arguin was not reflected by a higher metallothionein concentration in gills. The relatively low response in terms of MT can consequently be considered as a 'lack of answer' to this chronic moderate copper pollution (Serafim and Bebianno, 2009). Considering that immune system is more reactive to trematodes (Morley, 2006; Morley et al., 2006), no particular answer was expected here. In terms of population parameters, condition index, density and asymptotic shell length displayed high values. However, recruitment was null, both years. This latter result is sufficient to estimate that the population is not sustainable, due to an unfavourable environment, excluding the stress factors that were measured. The dominant role of environmental factors upon contaminants and pathogens was similarly mentioned in *Crassostrea virginica* (Volety, 2008).

Concerning clams from Arcachon Bay, numerous sources of stress were identified (Fig. 5). *Perkinsus* load reached  $10^5$  cells  $g^{-1}$  wet gill. That intensity can perturb physiological and immunological parameters of Manila clams but does not induce obvious mortality (Dang, 2009). Metal concentrations in the visceral mass corresponded to baseline levels compared to what was measured



in clams from non-contaminated sites (Ji et al., 2006). However, Arcachon's clams exhibited higher Cd, Cu and Zn concentrations than Landéda's clams did. Brown ring disease (BRD) was prevalent at a low level (<5%) and at an early stage of pathogenicity (Dang, 2009). Brown muscle disease was absent in this area. Trematode parasites, as already observed, have difficulties to infect *R. philippinarum* in their non-native area (Dang et al., 2009b). In terms of organism response, the concentration of MT was medium (but higher than at Landéda) which can partly be interpreted as a positive response to metal exposure, but also to *Perkinsus* infection. THC and percentage of granulocytes were not reactive to *Perkinsus*. Accordingly, the experimental approach already highlighted the stagnancy of THC in Manila clams challenged with *Perkinsus* (Hégaret et al., 2007; da Silva et al., 2008). All measured population parameters were low as already described in this area (Dang et al., 2010): median condition index was 48‰ with a maximum of 65‰ whereas it reached 131–142‰ in other sites (Laruelle et al., 1994). Recruitment consisted of few individuals per square meter, against 2000–2500 juveniles m<sup>-2</sup> in Musaka shoal, Japan (Ohba, 1959). Average density was 46 ind m<sup>-2</sup> when populations can reach 300–900 ind m<sup>-2</sup> (Ponurovsky and Selin, 1988; Breber, 2002; Toba, 2004). Finally, asymptotic length hardly reached 44 mm, with a potential of 48–85 mm (Bourne, 1982). However, asymptotic length can be worse as in Musaka shoal with 35 mm (Ohba, 1959). In conclusion, many stressors can contribute to the low performance of this population that remained sustainable and where some appropriate defences were observed (metal vs. MT and *Perkinsus* vs. percentage of granulocytes).

Manila clams from Landéda proposed a fourth scenario (Fig. 5). Two stressors affected these clams: *Perkinsus* and BRD. The strongest stressor was BRD that concerned one third of the population. No response was elicited by the organisms. Whereas BRD experimentally stimulates THC and % GR (Allam et al., 2000, 2001), this parameter remained low. In the field, Flye-Sainte-Marie et al. (2009) measured similar THC values in sites where BRD was present but with low prevalence and intensity. MT concentration was also low compared to what was observed at Arcachon, but no other field study using the same MT protocol analysis was available for Manila clams. The health population status was catastrophic: condition index and shell length were rather like at Arcachon, abundance was artificial (transplanted population) and recruitment was null. That transplanted clam population of Landéda had no chance of survival: stressors are numerous and deleterious and usual responses of organisms (MT, THC) are lacking. The environment certainly also has a responsibility in the non-sustainability of this population, particularly concerning the lack of recruitment.

This study gave a good illustration of the different scenarios that can occur between detected stressors, detected adaptive response of organisms and resulting population health. In the case of Arcachon's cockles, the moderate state of the population was due to environmental features, with certainly a significant effect of competition (high abundance of mussels and oysters, pers. obs.). For Arcachon's clams, some environmental features are unfavourable to population dynamics, like prolonged emersion time (Dang et al., 2010), but some identified stressors may also contribute to deficiency in condition index, growth and recruitment. In this case, individuals highlighted some defence mechanisms. At Landéda, the lack of cockle recruitment was due to temperature, hydrodynamism, and macroalgae proliferation rather than to gametogenesis that develops regularly in summer (Guillou et al., 1990). At this site, BRD must have detrimental effects on the clam population, and the environment may cause the same lack of recruitment observed in cockles.

This study suffers from numerous limitations. Many other stressors can be measured (PAH, pesticides, other metals and pathogens). The number of analysed biomarkers was also reduced

compared to batteries that can be employed (Cravo et al., 2009). As already mentioned, we deliberately excluded genetic markers that would have suffered from our averaged analysis. Immunological parameters are difficult to interpret. It is unclear which hemocytes are involved in which immune response and whether the response varies with bacterial, viral and parasitic infection. Stresses sometimes produces an early transient decrease of THC, but it is not obvious whether they lyse or leave the hemolymph in an orchestrated response (Hooper et al., 2007). These parameters are also sensitive to physical factors like temperature (Hégaret et al., 2003; Yu et al., 2009) or salinity (Reid et al., 2003).

Apart from these restrictions, this study gave a comprehensive view of the different populations and their strategy. For buried bivalves, Landéda appeared as a "hot spot" where stressors and other environmental features posed problems to the survival of populations. Arcachon did not provide the best conditions for Manila clams but the local population seemed to develop resistance patterns, at least against metal aggression. For cockles, Arcachon was the most appropriate spot allowing rather prosperous bivalve population dynamics. However, this situation encouraged the development of many benthic suspension feeders leading in fine to intra and interspecific competition. Moreover, field and experimental studies demonstrated strong interactions between metal and trematodes on bioaccumulation processes, and genetic and immune responses (Kim et al., 2008; Paul-Pont et al., 2010). On this account, this site appears as a hot spot for cockle population sustainability in relation to potential anthropogenic pressure.

Finally, this multistress analysis will be extended, with the same data base, by a more detailed approach at seasonal scale but also at individual scale. The averaged results also provided baselines parameters for multistress experiments in order to better understand the interactions between pollutants, and micro- and macroparasites, in bioaccumulation, infestation, gene expression, immunity and proteomic processes (Paul-Pont et al., 2010).

## Acknowledgements

This study was financed by the French 'Agence Nationale de la Recherche', in the project MULTISTRESS (Resp. X. de Montaudouin), and by the Conseil Régional Aquitaine. We are grateful to Referees for their comments and to Sarah Culloty for helping us to improve the manuscript.

Many thanks are due to all the colleagues that helped us, including Philippe Soudant, Francis Prince and Pascal Lebleu.

## References

- Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33, 123–128.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebrate Pathol.* 76, 63–69.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365–375.
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease. *Dis. Aquat. Org.* 48, 221–231.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Bachelet, G., Guillou, J., Labourg, P.-J., 1992. Adult-larval and juvenile interactions in the suspension-feeding bivalve, *Cerastoderma edule*: field observations and experiments. In: Colombo, G., Ferrari, L., Ceccherelli, V., Rossi, R. (Eds.), *Marine Eutrophication and Population Dynamics*. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 175–182.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A., 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol.* 118C, 361–367.
- Baudrimont, M., Andrés, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89–102.

- Baudrimont, M., de Montaudouin, X., Palvadeau, A., 2006. Impact of digenean parasites infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): a multivariate field monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 52, 494–502.
- Baudrimont, M., Marie, V., de Montaudouin, X., Gonzalez, P., Bourdinand, J.-P., Boudou, A., 2007. Confounding factors acting on metal-induced metallothionein synthesis in bivalve molluscs: reproductive cycle, parasitism and triploid status. In: Kungolos, A., Aravossis, K., Karagiannidis, A., Samaras, P. (Eds.), *Proceedings of the International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics, Skiathos, Greece*, pp. 217–223.
- Bergayou, H., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Moukrim, A., 2009. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 765–769.
- Blanchet, E., de Montaudouin, X., Lucas, A., Chardy, P., 2004. Heterogeneity of macrozoobenthic assemblages within a *Zostera noltii* seagrass bed: diversity, abundance, biomass and structuring factors. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61, 111–123.
- Bolam, S.G., Fernandes, T.F., Huxham, M., 2002. Diversity, biomass, and ecosystem processes in the marine benthos. *Ecol. Monogr.* 72, 599–615.
- Bourget, E., Brock, V., 1990. Short-term shell growth in bivalves: individual, regional, and age-related variations in the rhythm of deposition of *Cerastoderma (=Cardium) edule*. *Mar. Biol.* 106, 103–108.
- Bourne, N., 1982. Distribution, reproduction, and growth of the Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeves), in British Columbia. *J. Shellfish Res.* 2, 47–54.
- Breber, P., 2002. Introduction and acclimatisation of the Pacific carpet clam, *Tapes philippinarum*, to Italian waters. In: Leppäkoski, E., Gollasch, S. (Eds.), *Olefin Invasive Aquatic Species of Europe, Distribution, Impacts and Management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 120–126.
- Byrne, P.A., O'Halloran, J., 2001. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia* 465, 209–217.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476.
- Carnegie, R.B., 2005. Effects in mollusc culture. In: Rohde, K. (Ed.), *Marine Parasitology*. CSIRO & CABI, Collingwood, Australia, pp. 391–398.
- Cheggour, M., Chafik, A., Langston, W.J., Burt, G.R., Benbrahim, S., Texier, H., 2001. Metals in sediments and the edible cockle *Cerastoderma edule* from two Moroccan Atlantic lagoons: Moulay Bou Selham and Sidi Moussa. *Environ. Poll.* 115, 149–160.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Eble, A.F. (Ed.), *The Eastern Oyster*. Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland, USA, pp. 299–333.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In: Nagabhushanam, R. (Ed.), *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunology and Pathology*. Sciences Publishers, Inc., Enfield (NH, USA), pp. 43–83.
- Choi, K.-S., Wilson, E.A., Lewis, D.H., Powell, E.N., Ray, S.M., 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oyster: quantification of the thioglycollate method. *J. Sea Res.* 8, 125–131.
- Chu, F.-L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. *Rec. Adv. Mar. Biotechnol.* 5, 1–42.
- Cravo, A., Lopes, B., Serafim, A., Company, R., Barreira, L., Gomes, T., Bebianno, M.J., 2009. A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *J. Environ. Monitor.* 11, 1673–1686.
- da Silva, P.M., Hégaret, H., Lambert, C., Wikfors, G.H., Le Go, N., Shumway, S.E., Soudant, P., 2008. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. *Toxicon* 51, 563–573.
- Dang, C., 2009. Dynamique des populations de palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*) dans le Bassin d'Arcachon – Conséquences sur la gestion des populations exploitées, PhD thesis. University Bordeaux I.
- Dang, C., de Montaudouin, X., 2009. Brown Muscle Disease and Manila clam *Ruditapes philippinarum* dynamics in Arcachon Bay, France. *J. Shellfish Res.* 28, 355–362.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Caill-Milly, N., 2008. Brown Muscle Disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Arcachon bay (SW France). *Dis. Aquat. Org.* 80, 219–228.
- Dang, C., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Bonami, J.R., Caill-Milly, N., de Montaudouin, X., 2009a. Virus-like particles associated with Brown Muscle Disease in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Arcachon Bay (France). *J. Fish Dis.* 32, 577–584.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Bald, J., Jude, F., Raymond, N., Lanceleur, L., Paul-Pont, I., Caill-Milly, N., 2009b. Testing the Enemy Release Hypothesis: trematode parasites in the non indigenous Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Hydrobiologia* 630, 139–148.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Gam, M., Parioisin, C., Caill-Milly, N., 2010. The Manila clam population in Arcachon Bay (SW France): can it be kept sustainable? *J. Sea Res.* 63, 108–118.
- de Montaudouin, X., Thielges, D.W., Gam, M., Krakau, M., Pina, S., Baza, H., Dabouineau, L., Russell-Pinto, F., Jensen, K.T., 2009. Review – digenean trematode species in the cockle *Cerastoderma edule*: identification key and distribution along the North-East Atlantic shoreline. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 80, 543–556.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species – *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064.
- Desclaux, C., de Montaudouin, X., Bachelet, G., 2002. Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Dis. Aquat. Org.* 52, 137–149.
- Desclaux, C., de Montaudouin, X., Bachelet, G., 2004. Cockle (*Cerastoderma edule*) population mortality: the role of the digenean parasite *Himasthla quissetensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 279, 141–150.
- Desclaux, C., Russell-Pinto, F., de Montaudouin, X., Bachelet, G., 2006. First record and description of metacercariae of *Curcutteria arguinae* n. sp. (Digenea: Echinostomatidae), parasite of cockles *Cerastoderma edule* (Mollusca: Bivalvia) in Arcachon Bay, France. *J. Parasit.* 92, 578–587.
- Desclaux-Marchand, C., Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., de Montaudouin, X., 2007. Metallothionein gene identification and expression in the cockle (*Cerastoderma edule*) under parasitism (trematodes) and cadmium contaminations. *Aquat. Living Resour.* 20, 43–49.
- Ducrotot, J.P., Rybarczyk, H., Souprayan, J., Bachelet, G., Beukema, J.J., Desprez, M., Dörjes, J., Essink, K., Guillou, J., Michaelis, H., Sylvand, B., Wilson, J.G., Elkaim, B., Ibanez, F., 1991. A comparison of the population dynamics of the cockle (*Cerastoderma edule*, L.) in North-Western Europe. In: Elliott, M., Ducrotot, J.-P. (Eds.), *Estuaries and Coasts: spatial and temporal intercomparisons*. Olsen & Olsen, pp. 173–184.
- Elandaloussi, L.M., Carrasco, N., Roque, A., Fernández-Tejedor, M., Furones, D., 2008. Occurrence of *Perkinsus* sp. in two clam species (*Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*) from the Ebro delta, Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 28, 1–9.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Go, N., Goncalves, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1–11.
- Gam, M., 2008. Dynamique des systèmes parasites-hôte, entre trématodes digènes et coque *Cerastoderma edule*: comparaison de la lagune Merja Zerga avec le Bassin d'Arcachon. Hassan II A Chock & Bordeaux 1.
- Gam, M., de Montaudouin, X., Baza, H., 2009. Do trematode parasites affect cockle (*Cerastoderma edule*) secondary production and elimination? *J. Mar. Biol. Ass. UK* 89, 1395–1402.
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev. Fish. Sci.* 16, 131–154.
- Guillou, J., Bachelet, G., Desprez, M., Ducrotot, J.P., Madani, I., Rybarczyk, H., Sauriau, P.-G., Sylvand, B., Elkaim, B., Glémarec, M., 1990. Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique. *Aquat. Living Resour.* 3, 29–41.
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H., Ishioka, H., 1998. *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.* 33, 473–480.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation – II Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007. Hemocyte response of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84, 469–479.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorf, K., 2007. Stress and immune response in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363–379.
- Jensen, K.T., 1992. Dynamics and growth of the cockle, *Cerastoderma edule*, on an intertidal mud-flat in the Danish Wadden Sea: effects of submersion time and density. *Neth. J. Sea Res.* 28, 335–345.
- Ji, J., Choi, H.J., Ahn, I.-Y., 2006. Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Mar. Poll. Bull.* 52, 447–468.
- Jung, K., Stelzenmüller, V., Zauke, G.-P., 2006. Spatial distribution of heavy metal concentrations and biomass indices in *Cerastoderma edule* Linnaeus (1758) from the German Wadden Sea: an integrated biomonitoring approach. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 338, 81–95.
- Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. In: Abelson, J.N., Simon, M.I. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, pp. 613–626.
- Kim, Y., Powell, E.N., Wade, T.L., Presley, B.J., 2008. Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA status and trends "mussel watch" program. *Mar. Environ. Res.* 65, 101–127.
- Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.-F., 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276–288.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y.M., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 74, 351–366.
- Lassalle, G., de Montaudouin, X., Soudant, P., Paillard, C., 2007. Parasite co-infection of two sympatric bivalves, the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the cockle (*Cerastoderma edule*) along a latitudinal gradient. *Aquat. Living Resour.* 20, 33–42.
- Leinão, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 140, 408–421.

- Marie, D., Partensky, F., Vulot, D., Brussaard, C.P.D., 1999. Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In: Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Dean, P.N., Orfao, A., Rabinovitch, P., Stewart, C., Tanke, H.J., Wheelless, L. (Eds.), *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 11–15.
- Morley, N.J., 2006. Parasitism as a source of potential distortion in studies on endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Mar. Poll. Bull.* 52, 1330–1332.
- Morley, N.J., Lewis, J.W., Hoole, D., 2006. Pollutant-induced effects on immunological and physiological interactions in aquatic host-trematode systems: implications for parasite transmission. *J. Helminthol.* 80, 137–149.
- Ohba, S., 1959. Ecological studies in the natural population of a clam, *Tapes japonica*, with special reference to seasonal variations in the size and structure of the population and to individual growth. *Biol. J. Okayama Univ.* 5, 13–42.
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17, 467–475.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invertebrate Pathol.* 65, 101–110.
- Paillard, C., Maes, P., Mazurié, J., Claude, S., Marhic, A., Le Pennec, M., 1997. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. In: 8th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. Association pour l'Etude de l'Epidémiologie et des Maladies animales, pp. 8–11.
- Park, K.-I., Tsutsumi, H., Hong, J.-S., Choi, K.-S., 2008. Pathology survey of the short-neck *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *J. Invertebrate Pathol.* 99, 212–219.
- Paul-Pont, I., Baudrimont, M., Gonzalez, P., de Montaudouin, X., 2007. Reproductive cycle modulates metallothionein synthesis in the cockle (*Cerastoderma edule*) after parasite and cadmium contamination. In: Kungolos, A., Aravossis, K., Karagiannidis, A., Samaras, P. (Eds.), *Proceedings of the International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics*, Skiathos, Greece, pp. 89–95.
- Paul-Pont, I., Baudrimont, M., Gonzalez, P., de Montaudouin, X., 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Mar. Poll. Bull.* 60, 515–525.
- Ponurovsky, S.K., Selin, I.N., 1988. Distribution, population structure, and growth of the bivalve mollusk *Ruditapes philippinarum* in Vostok Bay, Sea of Japan. 11–15.
- Ray, S.M., 1966. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Ass.* 54, 55–69.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T.H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 56, 249–258.
- Reise, K., Herre, E., Sturm, M., 1994. Biomass and abundance of macrofauna in intertidal sediments of Königshafen in the northern Wadden Sea. *Helgol. Meeresunters.* 48, 201–215.
- Serafim, M.A., Bebianno, M.J., 2009. Metallothionein role in the kinetic of copper accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussatus*. *Environ. Res.* 109, 390–399.
- Sokal, R., Rohlf, F., 1981. *Biometry*. WH Freeman, New York.
- Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) philippinarum*. *Aquaculture*, 401–418.
- Sures, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol.* 20, 170–177.
- Thieltges, D.W., Reise, K., 2006. Metazoan parasites in intertidal cockles *Cerastoderma edule* from the northern Wadden Sea. *J. Sea Res.* 56, 284–293.
- Toba, M., 2004. The decline of Manila clam stock in Tokyo Bay. *Bull. Fish. Res. Agen.* 1, 13–18.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–717.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Wang, W.-X., Hendriks, A.J., 2008. Metal bioaccumulation in aquatic species: quantification of uptake and elimination rate constants using physicochemical properties of metals and physiological characteristics of species. *Environ. Sci. Technol.* 42, 852–858.
- Verlecar, X.N., Pereira, N., Desai, S.R., Jena, K.B., Snigdha, 2006. Marine pollution detection through biomarkers in marine bivalves. *Curr. Sci.* 91, 1153–1157.
- Villalba, A., Reece, K.S., Ordás, M.C., Casas, S.M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.* 17, 411–432.
- Volety, A.K., 2008. Effects of salinity, heavy metals and pesticides on health and physiology of oysters in the Caloosahatchee Estuary, Florida. *Ecotoxicology* 17, 579–590.
- Walne, P.R., Mann, R., 1975. Growth and biogeochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In: Barnes, H. (Ed.), 9th European Marine Biology Symposium. Aberdeen University Press, pp. 587–607.
- Wootton, E.C., Dyrnyda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish. Shellfish Immunol.* 15, 195–210.
- Yu, J.H., Song, J.H., Choi, M.C., Park, S.W., 2009. Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Macrura veneriformis* (Bivalvia: Macruridae). *J. Invertebrate Pathol.* 102, 30–35.

**Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires : Cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée**

**Résumé :** L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence les caractéristiques structuro-fonctionnelles d'un type cellulaire précis, les hémocytes de bivalves. Les outils analytiques tels que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ont permis une investigation approfondie des composants lipidiques membranaires. La composition détaillée des classes et sous-classes de phospholipides ainsi que les spécificités de leur composition individuelles en acides gras ont été mises en évidence. De plus, l'utilisation de la cytométrie en flux a permis de caractériser un certain nombre de fonctions hémocytaires ainsi que la ploïdie des hémocytes.

La composition lipidique des membranes d'hémocytes chez quatre espèces de bivalves ; l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la palourde Japonaise, *Ruditapes philippinarum*, la coque *Cerastoderma edule* et la mye *Mya arenaria* a été finement caractérisée. Parmi les particularités principales, une forte teneur en plasmalogènes enrichis en acides gras « non méthylène interrompus » (NMI) et en 20:1n-11 a été mise en évidence pour la première fois dans des hémocytes. Ces acides gras présentent la particularité d'être biosynthétisés *de novo* par les bivalves marins. Les membranes des hémocytes sont également très riches en céramide aminoéthylphosphonate (CAEP) et en stérols.

La seconde étape a consisté à étudier les modifications des compositions lipidiques membranaires et des fonctions cellulaires potentiellement induites par la néoplasie disséminée, afin de dégager des liens structuro-fonctionnels au niveau membranaire. Pour ce faire, les cellules circulantes provenant d'animaux sains et d'animaux atteints par la néoplasie disséminée ont été comparées chez la coque du Bassin d'Arcachon et la mye de l'Île du prince Edouard (Canada). Dans le cas des coques, une proportion beaucoup plus faible d'espèces moléculaires plasmalogènes-acides gras NMI a été observée dans les membranes des cellules néoplasiques. Cette observation était associée à une activité phagocytaire plus faible et à une origine subcellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) différente. Chez les myes, une plus faible proportion de l'espèce moléculaire phosphatidylsérine plasmalogène-20:1n-11 associée une plus faible activité phagocytaire a été détectée dans les cellules circulantes des animaux affectés par la néoplasie disséminée.

Les caractéristiques de la néoplasie disséminée chez la coque du Bassin d'Arcachon sont apparues très différentes de celles observées chez la mye de l'Île du Prince Edouard, notamment au niveau de la ploïdie des cellules néoplasiques mais aussi de la prolifération cellulaire et de la prévalence des différents stades de développement de la maladie. Une progression différente de cette pathologie entre les deux espèces a été suggérée. Ceci pourrait expliquer les différences d'altérations des structures lipidiques membranaires des cellules néoplasiques entre ces deux espèces.

**Mots clés :** composition lipidique membranaire, fonctions cellulaires, *Cerastoderma edule*, *Mya arenaria*, néoplasie disséminée, plasmalogènes, acides gras NMI.

**Study of the relationships between membrane lipid compositions and cell functions: Case of hemocytes of bivalves affected by disseminated neoplasia**

**Abstract :** The aim of the works presented in this PhD thesis was to evidence structure-functional characteristics of a precise cell type, bivalve hemocytes. Analytical tools such as high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) allowed an in-depth investigation of membrane lipid components. Detailed composition of phospholipid classes and subclasses and their respective specific fatty acid composition were evidenced. Moreover, use of flow cytometry allowed characterizing some hemocyte cell functions and ploidy.

Membrane lipid composition of hemocytes was finely characterized in four bivalve species; the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, the edible cockle *Cerastoderma edule* and the soft-shell clam *Mya arenaria*. Among the main lipid particularities, a high content of plasmalogen enriched in non-methylene interrupted (NMI) fatty acids and in 20:1n-11 was evidenced for the first time in hemocytes. These fatty acids present the particularity to be biosynthesized *de novo* in marine bivalves. Hemocyte membranes were also found to be very rich in ceramide aminoethylphosphonate (CAEP) and in sterols.

The second step consisted in the study of the modifications of membrane lipid composition and cell functions potentially induced by disseminated neoplasia, in order to emerge structuro-functional links at the membrane level. For this purpose, circulating cells originating from healthy animals and from animals affected by disseminated neoplasia were compared in cockle from Arcachon Bay and in soft-shell clam from Prince-Edward-Island (Canada). In the case of cockles, a highly lower proportion of plasmalogen-NMI FA molecular species was observed in neoplastic cell membranes. This observation was associated to a lower phagocytic activity and a subcellular origin of reactive oxygen species (ROS) different. In soft-shell clams, a lower proportion of plasmalogen phosphatidylserine-20:1n-11 molecular species was associated to a lower phagocytic activity in circulating cells of animals affected by disseminated neoplasia.

Characteristics of disseminated neoplasia affecting cockles from Arcachon Bay appeared very different from the ones observed in soft-shell clam from Prince-Edward-Island, concerning particularly the ploidy of neoplastic cells but also their proliferation and the prevalence of the different development stages of the disease. A different progression of the pathology was suggested. These This could explain the observed differences in membrane lipid structure alterations of neoplastic cells between the two species.

**Keywords :** membrane lipid composition, cell functions, *Cerastoderma edule*, *Mya arenaria*, disseminated neoplasia, plasmalogens, NMI fatty acids.